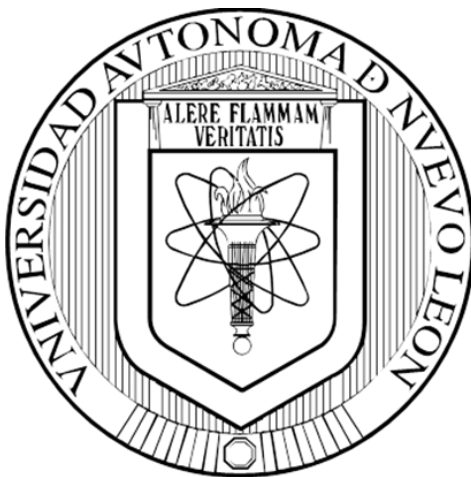


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS CONSTITUYENTES DE
LAS HOJAS DE *Cissus incisa*, DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA, CITOTÓXICA Y MECANISMO DE ACCIÓN DEL
COMPUESTO MÁS ACTIVO**

POR

MC DEYANI NOCEDO MENA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN FARMACIA**

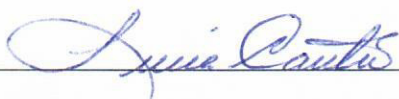
DICIEMBRE, 2019

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN
DE LOS CONSTITUYENTES DE LAS HOJAS DE *Cissus incisa*,
DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA, CITOTÓXICA Y
MECANISMO DE ACCIÓN DEL COMPUESTO MÁS ACTIVO**

Aprobación de la tesis



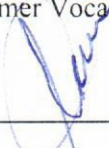
Dra. María del Rayo Camacho Corona
Presidente



Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas
Secretario



Dra. Patricia Cristina Esquivel Ferriño
Primer Vocal



Dra. Yolanda Araceli Gracia Vásquez
Segundo Vocal



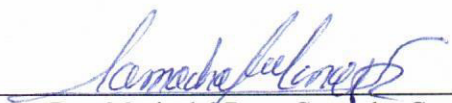
Dra. Verónica Mayela Rivas Galindo
Tercer Vocal



Dra. María Elena Cantú Cárdenas
Subdirectora de Posgrado

Revisión de la tesis:

**ASLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN
DE LOS CONSTITUYENTES DE LAS HOJAS DE *Cissus incisa*,
DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA, CITOTÓXICA Y
MECANISMO DE ACCIÓN DEL COMPUESTO MÁS ACTIVO**



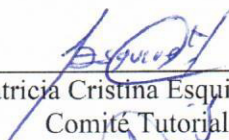
Dra. María del Rayo Camacho Corona
Director de Tesis



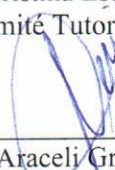
Dr. Edgar Abraham García Zepeda
Co-Director de Tesis



Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas
Comité Tutorial



Dra. Patricia Cristina Esquivel Ferriño
Comité Tutorial



Dra. Yolanda Araceli Gracia Vásquez
Comité Tutorial



Dra. Verónica Mayela Rivas Galindo
Comité Tutorial

Dra. Leticia González Maya
Comité Tutorial

AGRADECIMIENTOS

Dra. María del Rayo Camacho Corona

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.
Por su acertada dirección y apoyo incondicional en la realización de este proyecto de investigación.

Dr. Edgar Abraham García Zepeda

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.
Por sus aportaciones realizadas en el cumplimiento de los objetivos de esta Tesis.

COMITÉ TUTORIAL

Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas

Dra. Patricia Cristina Esquivel Ferriño

Dra. Yolanda Araceli Gracia Vásquez

Por sus valiosas contribuciones a nuestra investigación, por las sugerencias y correcciones realizadas durante los comités tutoriales, seminarios y al documento final de Tesis.

Dra. Verónica Mayela Rivas Galindo

Departamento de Química Analítica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Por la realización de los experimentos de Resonancia Magnética Nuclear de los productos naturales y derivados, por las sugerencias y correcciones al documento final de Tesis.

Dra. Elvira Garza González

Servicio de Gastroenterología, Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Por brindar la infraestructura y apoyo para la realización de ensayos antibacterianos.

Dra. Leticia González Maya

Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Por la infraestructura y la realización de ensayos de citotoxicidad.

Dra. Laura Álvarez Berber

Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Por la infraestructura y el análisis del extracto hexánico por CG-EM.

Dra. María Yolanda Ríos

Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Por la infraestructura y el análisis de los esfingolípidos por UPLC-QToF-MS.

Dr. José Rodríguez Rodríguez

Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey.

Por la infraestructura y análisis de muestras por CG-EM.

Dr. Francisco Guadalupe Ávalos Alanís

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Por la asesoría para la realización de la reacción de metanólisis.

Dr. Humberto González Díaz

Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del País Vasco (UPV).

Por la oportunidad de realizar la estancia de investigación y el asesoramiento en la redacción y publicación de artículo en *Journal of Chemical Information and Modeling*.

Dr. César Augusto Martín

Instituto de Biofísica, Universidad del País Vasco.

Por la infraestructura y la realización de ensayos de liberación de contenidos vesiculares.

Dr. Cristian R. Munteanu

Facultad de Ciencias Computacionales, Universidad de Coruña, España.

Por la infraestructura y realización del docking molecular al compuesto más activo de la actividad antibacteriana.

Dra. Patricia Navarro

Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del País Vasco.

Por su apoyo en la realización de UPLC-QToF-MS.

Dra. Sonia Arrasate Gil

Departamento de Química II, Facultad de Ciencia y Tecnología, UPV.

Por su apoyo incondicional en todos los ensayos durante la estancia de investigación.

Agradezco de todo corazón a todos mis familiares, amigos y compañeros de trabajo del Laboratorio QPNS.



Facultad de Ciencias Químicas

Laboratorio de Química de Productos Naturales y Sintéticos

División de Estudios de Posgrado, Universidad Autónoma de Nuevo León

Por la infraestructura y apoyo en la realización del proyecto de Tesis de Doctorado.



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Por la beca de manutención otorgada para la realización de los estudios de Doctorado en Ciencias con Orientación en Farmacia (605522).

DEDICATORIA

Primeramente, a Dios, con Él todo, sin Él, nada

***A mis padres, porque me enseñaron a luchar por mis metas sin olvidar quién soy y de
dónde vengo***

A Daniela, por ser mi fuerza y mi inspiración

A Ore, por todo tu apoyo para lograr este sueño que también hiciste tuyo

A Fefa, porque te querré siempre

RESUMEN

MC. Deyani Nocado Mena

Fecha de graduación: Diciembre/2019

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del estudio: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS CONSTITUYENTES DE LAS HOJAS DE *Cissus incisa*, DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA, CITOTÓXICA Y MECANISMO DE ACCIÓN DEL COMPUESTO MÁS ACTIVO

Número de páginas: 273

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con Orientación en Farmacia

Área de estudio: Farmacia

Propósito y método de estudio:

En la actualidad, dos serios problemas de salud pública a escala mundial ocupan la atención de la comunidad científica internacional, debido un aumento gradual de su incidencia y mortalidad: la proliferación de la resistencia bacteriana, y el aumento de la resistencia de las células cancerígenas a la quimioterapia. En este sentido, los productos naturales o sus derivados juegan un papel fundamental en el descubrimiento y desarrollo de compuestos estructuralmente diversos con mecanismos de acción distintos a los de los medicamentos actuales.

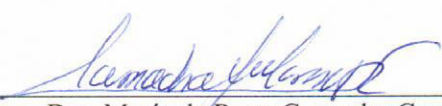
Los esfuerzos para validar científicamente el uso de especies mexicanas en la medicina tradicional nos condujeron al estudio de *Cissus incisa*. Especie que hasta el momento no cuenta con reportes en la literatura de su composición química y actividad farmacológica que certifiquen su uso para tratar infecciones en la piel, abscesos, y tumores. De las hojas de *C. incisa* se obtuvieron tres extractos: hexánico, cloroformo/metanol y acuoso. El extracto hexánico fue analizado por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM). Por su parte, el extracto cloroformo/metanol fue sometido a varias columnas cromatográficas para aislar y purificar los compuestos mayoritarios. La estructura química de estos productos naturales fue determinada utilizando métodos espectroscópicos y espectrométricos. Posteriormente, fueron evaluados para determinar su actividad antibacteriana y citotóxica. De los resultados obtenidos para ambas actividades biológicas fue seleccionado el producto natural más activo. Al mismo se le propuso un posible mecanismo de acción basado en las evidencias de estudios bioinformáticos y mediante un ensayo de liberación de contenidos vesiculares.

Conclusiones y contribuciones:

Del extracto hexánico se identificaron por CG-EM 17 compuestos, entre ellos: 9 alcanos, 6 terpenos, un esterol y una cetona, siendo el compuesto más abundante el β -sitosterol.

Del extracto cloroformo/metanol se aislaron y caracterizaron: el β -sitosterol (**CIH-2**); tetracosanoato de 2,3-dihidroxipropilo (**CIH-7**); β -D-glucopiranosido de β -sitosterol (**CIH-8**); α -amirina-3-O-glucopiranosido (**CIH-11**); y (2S, 3S, 4R, 8E)-2-[(2'R)-2'-hidroxidecanoil amino]-1,3,4-hexadecanotriol-8-eno (**CIH-15**). Adicionalmente se obtuvieron varios sólidos que tras ser analizados utilizando CG-EM y técnicas espectrométricas resultaron como mezclas de hidrocarburos alifáticos (**CIH-1**), alcohol y epóxido (**CIH-3**), triterpenoides (**CIH-5**), ceramidas (**CIH-13**) y cerebrósidos (**CIH-10**). Se reporta por primera vez la caracterización estructural de (2S,3S,4R,8E)-2-tritriacont-9-enoil amino]-1,3,4-octadecanotriol-8-eno (**CIH-13-I**); (2S,3S,4R,8E)-2-[(2'R)-2',3'-dihidroxi-octacosanoil amino]-1,3,4-octadecanotriol-8-eno (**CIH-13-II**); (2S,3S,4R,8E)-2-[(2'R)-2'-hidroxinonacosanoil amino]-1,3,4-octadecanotriol-8-eno (**CIH-13-IV**); (2S,3S,4R,8E)-2-[(2'R)-2'-hidroxidecanoil amino]-1,3,4-hexadecanotriol-8-eno (**CIH-15**); 1-O- β -glucopiranosil-(2S,3S,4R,8Z)-2-[(2'R)-2'-hidroxitricos-9-enoil amino]-1,3,4-octadecanotriol-8-eno (**CIH-10-IV**); 1-O- β -glucopiranosil-(2S,3S,4R,8Z)-2-[(2'R)-2'-hidroxiheptacos-9-enoil amino]-1,3,4-octadecanotriol-8-eno (**CIH-10-V**). De igual forma es el primer reporte dentro del género *Cissus* del cicloursanol, del tetracosanoato de 2,3-dihidroxipropilo, así como de todas las ceramidas y cerebrósidos obtenidos en este estudio.

Los extractos hexánico y cloroformo/metanol fueron activos contra las nueve bacterias resistentes ensayadas, con valores de CMI en el rango de 125 a 500 $\mu\text{g/mL}$. La mejor actividad antibacteriana la presentó el extracto cloroformo/metanol, frente a las cepas *E. faecium* resistente a Vancomicina, *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos con valores de 125 $\mu\text{g/mL}$. Igualmente, las ceramidas CIH-13 resultaron las más activas con CMI de 50 $\mu\text{g/mL}$ frente a *A. baumannii* resistente a carbapenémicos. Los mejores resultados para la actividad citotóxica fueron la del extracto hexánico frente a HepG2 con $\text{IC}_{50} = 30 \pm 6$ $\mu\text{g/mL}$ y frente a Hep3B ($\text{IC}_{50} = 27 \pm 3$ $\mu\text{g/mL}$). Entre los compuestos el β -D-tetraacetil glucopiranosido de β -sitosterilo resultó el más activo frente a PC3 con $\text{IC}_{50} = 43 \pm 4$ $\mu\text{g/mL}$. Para esbozar un posible mecanismo de acción se realizaron estudios bioinformáticos para el compuesto mayoritario de CIH-13, evidenciando que las ceramidas actúan a nivel de las membranas celulares fundamentalmente para las bacterias Gram-negativas. Lo cual se reafirmó mediante el ensayo de liberación de contenidos vesiculares utilizando liposomas unilamelares. Se observó un flujo de solutos hacia el exterior evidenciando la perturbación que sufre la barrera de permeabilidad de las membranas celulares por la acción de las ceramidas. Se acepta la hipótesis propuesta porque al menos un constituyente químico de las hojas de *C. incisa* presentó actividad antibacteriana, y un mecanismo de acción diferente a levofloxacina que fue el fármaco de referencia. Adicionalmente se justifica el uso de la planta en la medicina tradicional mexicana.


Dra. María de Rayo Camacho Corona
Director de Tesis



Dr. Edgar Abraham García Zepeda
Co-Director de Tesis

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo		Página
1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Enfermedades infecciosas	1
1.1.1	Infecciones causadas por bacterias	2
1.1.2	Infecciones nosocomiales	3
1.1.3	Epidemiología de las infecciones bacterianas	5
1.1.4	Tratamiento de las enfermedades infecciosas bacterianas	6
1.1.5	Resistencia bacteriana	11
1.1.5.1	Mecanismos de resistencia bacteriana	12
1.1.6	Infecciones causadas por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	13
1.1.6.1	Epidemiología y tratamiento de la Tuberculosis	14
1.1.6.2	Tuberculosis multifarmacorresistente	16
1.2	Cáncer	17
1.2.1	Epidemiología del cáncer	17
1.2.2	Tratamiento del cáncer y su problemática	19
1.3	Las plantas como fuentes potenciales de fármacos	20
1.4	Estudios quimioinformáticos en la investigación y desarrollo de fármacos	22
1.5	Sistemas modelo de membranas	23
1.5.1	Liposomas	23
2.	ANTECEDENTES	26
2.1	Medicina Tradicional en México	26
2.2	Género <i>Cissus</i>	27
2.2.1	<i>Cissus incisa</i>	29
2.3	Justificación	30
3.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	31
3.1	Hipótesis	31
3.2	Objetivos	31
3.2.1	Objetivo general	31
3.2.2	Objetivos específicos	32
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	33
4.1	Materiales y equipos	33
4.1.1	Parte fitoquímica	33
4.1.2	Ensayos biológicos	34
4.1.3	Parte computacional	35
4.1.4	Ensayo de liberación de contenidos vesiculares	35
4.2	Estudio fitoquímico de las hojas de <i>Cissus incisa</i>	35
4.2.1	Material vegetal	35
4.2.3	Preparación de extractos	36
4.3	Análisis del extracto hexánico por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM)	36
4.4	Fraccionamiento del extracto cloroformo/metanol	37
4.4.1	Aislamiento y purificación de los compuestos del extracto cloroformo/metanol	38
4.4.1.1	Aislamiento y purificación de CIH-1	38
4.4.1.2	Aislamiento y purificación de CIH-3	39

4.4.1.3	Aislamiento y purificación de CIH-5	39
4.4.1.4	Aislamiento y purificación de CIH-15	39
4.4.1.5	Aislamiento y purificación de CIH-2	40
4.4.1.6	Aislamiento y purificación de CIH-7	40
4.4.1.7	Aislamiento y purificación de CIH-8 y CIH-11	40
4.4.1.8	Aislamiento y purificación de CIH-10 y CIH-13	40
4.5	Acetilación	41
4.6	Análisis de algunos compuestos por UPLC-QToF-MS	42
4.7	Ensayos biológicos	45
4.7.1	Actividad antibacteriana	45
4.7.1.1	Cepas bacterianas y cultivo	45
4.7.1.2	Preparación de muestras	46
4.7.1.3	Preparación del inóculo	46
4.7.1.4	Ensayo biológico	46
4.7.2	Actividad antimicobacteriana	47
4.7.2.1	Cepas y cultivo	47
4.7.2.2	Preparación del inóculo	47
4.7.2.3	Ensayo biológico	47
4.7.3	Actividad citotóxica	48
4.7.3.1	Líneas celulares y cultivo	48
4.7.3.2	Ensayo biológico	49
4.7.3.3	Índice de Selectividad	49
4.8	Técnicas para determinar el posible mecanismo de acción del compuesto antibacteriano más activo	50
4.8.1	Construcción del modelo computacional predictivo	50
4.8.2	Docking molecular	55
4.8.3	Ensayo de liberación de contenidos vesiculares	56
4.8.3.1	Preparación de LUV con solutos encapsulados	56
4.8.3.2	Determinación de la concentración de fosfolípidos	57
4.8.3.3	Liberación de contenidos encapsulados en LUV	57
4.9	Disposición de residuos	59
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
5.1	Estudio fitoquímico de las hojas de <i>C. incisa</i>	60
5.1.1	Resultados del análisis del extracto hexánico por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM)	60
5.1.2	Elucidación estructural de compuestos del extracto CHCl ₃ /MeOH	62
5.1.2.1	Propiedades físicas y espectroscópicas de CIH-1	63
5.1.2.1.1	Identificación de los constituyentes de CIH-1	63
5.1.2.1.1.1	Análisis de CIH-1 por CG-EM	65
5.1.2.2	Propiedades físicas y espectroscópicas de CIH-3	66
5.1.2.2.1	Identificación de los constituyentes de CIH-3	66

5.1.2.2.1.1	Análisis de CIH-3 por CG-EM	66
5.1.2.3	Propiedades físicas y espectroscópicas de tetracosanoato de 2,3-dihidroxi- <i>propilo</i> (CIH-7)	68
5.1.2.3.1	Elucidación estructural de tetracosanoato de 2,3-dihidroxi- <i>propilo</i> (CIH-7)	69
5.1.2.4	Propiedades físicas y espectroscópicas de β -sitosterol (CIH-2)	74
5.1.2.4.1	Elucidación estructural de β -sitosterol (CIH-2)	75
5.1.2.5	Propiedades físicas y espectroscópicas de acetato de β -sitosterilo (CIH-2Ac)	79
5.1.2.5.1	Elucidación estructural del acetato de β -sitosterilo (CIH-2Ac)	80
5.1.2.6	Propiedades físicas y espectroscópicas de β -D-glucopiranosido de β -sitosterol (CIH-8)	84
5.1.2.6.1	Elucidación estructural de β -D-glucopiranosido de β -sitosterol (CIH-8)	85
5.1.2.7	Propiedades físicas y espectroscópicas de β -D-tetraacetyl glucopiranosido de β -sitosterilo (CIH-8Ac)	92
5.1.2.7.1	Elucidación estructural de β -D-tetraacetyl glucopiranosido de β -sitosterilo (CIH-8Ac)	93
5.1.2.8	Propiedades físicas y espectroscópicas de CIH-5	100
5.1.2.8.1	Elucidación estructural de la muestra CIH-5	100
5.1.2.8.1.1	Análisis de la muestra CIH-5Ac por CG-EM	102
5.1.2.9	Propiedades físicas y espectroscópicas de α -amirina-3- <i>O</i> -glucopiranosido (CIH-11)	104
5.1.2.9.1	Elucidación estructural de 3- <i>O</i> - β -D-glucopiranosido de α -amirina (CIH-11)	105
5.1.2.10	Propiedades físicas y espectroscópicas de tetraacetyl 3- <i>O</i> - β -D-glucopiranosido de α -amirina (CIH-11Ac)	112
5.1.2.10.1	Elucidación estructural de tetraacetyl 3- <i>O</i> - β -D-glucopiranosido de α -amirina (CIH-11Ac)	113
5.1.2.11	Propiedades físicas y espectroscópicas de CIH-13	118
5.1.2.11.1	Elucidación estructural de CIH-13	119
5.1.2.12	Propiedades físicas y espectroscópicas de CIH-13Ac	133
5.1.2.12.1	Elucidación estructural de CIH-13Ac	134
5.1.2.13	Propiedades físicas y espectroscópicas de 2-(2'-hidroxidecanoil amino)-1,3,4-hexadecanotriol-8-eno (CIH-15)	142
5.1.2.13.1	Elucidación estructural de 2-(2'-hidroxidecanoil amino)-1,3,4-hexadecanotriol-8-eno (CIH-15)	142
5.1.2.14	Propiedades físicas y espectroscópicas de 2-(2'-acetoxidecanoil amino)-1,3,4-hexadecanotriacetat-8-eno (CIH-15Ac)	149
5.1.2.14.1	Elucidación estructural de 2-(2'-acetoxidecanoil amino)-1,3,4-hexadecanotriacetat-8-eno (CIH-15Ac)	150

5.1.2.15	Propiedades físicas y espectroscópicas de CIH-10	158
5.1.2.15.1	Elucidación estructural de CIH-10	159
5.1.2.16	Propiedades físicas y espectroscópicas de CIH-10Ac	177
5.1.2.16.1	Elucidación estructural de CIH-10Ac	178
5.2	Ensayos biológicos	187
5.2.1	Actividad antibacteriana y antimicobacteriana	187
5.2.2	Actividad citotóxica e índice de selectividad	194
5.2.2.1	Actividad citotóxica e índice de selectividad de extractos	194
5.2.2.2	Actividad citotóxica e índice de selectividad de los compuestos	196
5.3	Determinación del mecanismo de acción del compuesto más activo	204
5.3.1	Modelo computacional predictivo	204
5.3.1.1	Aplicación del modelo en la identificación de las dianas para CIH-13	206
5.3.2	Docking molecular	209
5.3.3	Ensayo de liberación de contenidos vesiculares	214
6.	CONCLUSIONES	218
7.	PERSPECTIVAS	220
8.	BIBLIOGRAFÍA	221
APÉNDICES		241
	APÉNDICE A. Datos espectroscópicos y espectrométricos adicionales de productos naturales y derivados semi-sintéticos de las hojas de <i>C. incisa</i>	241
	APÉNDICE B. Difusión de la Investigación	250
RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO		256

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Naturaleza de un liposoma	24
2. Tipos de liposomas	24
3. Hojas, frutos y flores de <i>C. incisa</i>	30
4. Diagrama de flujo de trabajo para la obtención de los extractos	37
5. Reacción general de la acetilación	41
6. Cromatograma de Gases del extracto hexánico	60
7. Composición química del extracto hexánico	62
8. Espectro de IR de CIH-1	63
9. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de CIH-1	64
10. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de CIH-1	64
11. Cromatograma de la muestra CIH-1	65
12. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de CIH-3	67
13. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de CIH-3	67
14. Cromatograma de gases de CIH-3	68
15. Estructura de tetracosanoato de 2,3-dihidroxiopropilo (CIH-7)	68
16. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de CIH-7	71
17. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de CIH-7	72
18. Espectro EM-IE de tetracosanoato de 2,3-dihidroxiopropilo (CIH-7)	73
19. Mecanismo de fragmentación de CIH-7 con la obtención del pico base	73
20. Estructura de β -sitosterol (CIH-2)	74
21. Espectro IR del β -sitosterol (CIH-2)	76
22. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) del β -sitosterol (CIH-2)	77
23. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) del β -sitosterol (CIH-2)	78
24. Estructura de acetato de β -sitosterilo (CIH-2Ac)	79
25. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de acetato de β -sitosterilo (CIH-2Ac)	81
26. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de acetato de β -sitosterilo (CIH-2Ac)	82
27. Estructura de β -D-glucopiranosido de β -sitosterol (CIH-8)	84
28. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de β -D-glucopiranosido de β -sitosterol (CIH-8)	86
29. Espectro COSY de β -D-glucopiranosido de β -sitosterol (CIH-8)	87
30. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de β -D-glucopiranosido de β -sitosterol (CIH-8)	88
31. Espectro HSQC de β -D-glucopiranosido de β -sitosterol (CIH-8)	89
32. Espectro HMBC de β -D-glucopiranosido de β -sitosterol (CIH-8)	90
33. Estructura de β -D-tetraacetil glucopiranosido de β -sitosterilo (CIH-8Ac)	92
34. Espectro RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de β -D-tetraacetil glucopiranosido de β -sitosterilo (CIH-8Ac)	96
35. Espectro COSY de β -D-tetraacetil glucopiranosido de β -sitosterilo (CIH-8Ac)	97
36. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de β -D-tetraacetil glucopiranosido de β -sitosterilo (CIH-8Ac)	98

37. Espectro HMBC de β -D-tetraacetil glucopiranosido de β -sitosterilo (CIH-8Ac)	99
38. Espectro de IR de CIH-5	100
39. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de CIH-5	101
40. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de CIH-5	101
41. Cromatograma de Gases de CIH-5Ac	102
42. Terpenoides identificados en CIH-5Ac	103
43. Estructura de 3- <i>O</i> - β -D-glucopiranosido de α -amirina (CIH-11)	104
44. Espectro RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de 3- <i>O</i> - β -D-glucopiranosido de α -amirina (CIH-11)	108
45. Espectro COSY de 3- <i>O</i> - β -D-glucopiranosido de α -amirina (CIH-11)	109
46. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de 3- <i>O</i> - β -D-glucopiranosido de α -amirina (CIH-11)	110
47. Espectro HSQC de 3- <i>O</i> - β -D-glucopiranosido de α -amirina (CIH-11)	111
48. Espectro HMBC de 3- <i>O</i> - β -D-glucopiranosido de α -amirina (CIH-11)	111
49. Estructura de tetraacetil 3- <i>O</i> - β -D-glucopiranosido de α -amirina (CIH-11Ac)	112
50. Espectro RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de tetraacetil 3- <i>O</i> - β -D-glucopiranosido de α -amirina (CIH-11Ac)	114
51. Espectro COSY de tetraacetil 3- <i>O</i> - β -D-glucopiranosido de α -amirina (CIH-11Ac)	115
52. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de tetraacetil 3- <i>O</i> - β -D-glucopiranosido de α -amirina (CIH-11Ac)	116
53. Espectro HSQC (expansión) de tetraacetil 3- <i>O</i> - β -D-glucopiranosido de α -amirina (CIH-11Ac)	117
54. Espectro HMBC de tetraacetil 3- <i>O</i> - β -D-Glucopiranosido de α -amirina (CIH-11Ac)	117
55. Estructuras de los compuestos identificados en las ceramidas CIH-13	118
56. Espectro RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 80:20) de CIH-13	123
57. Espectro COSY de CIH-13	124
58. Espectro RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 80:20) de CIH-13	125
59. Espectro HSQC de CIH-13	126
60. Cromatograma de UPLC-QToF-MS de CIH-13	127
61. Espectro HRMS-ESI de CIH-13-I	128
62. Espectro HRMS-ESI de CIH-13-II	129
63. Espectro HRMS-ESI de CIH-13-III	130
64. Espectro HRMS-ESI de CIH-13-IV	131
65. Estructuras de los compuestos en CIH-13Ac	133
66. Espectro RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de CIH-13Ac	137
67. Espectro COSY de CIH-13Ac	138
68. Espectro RMN ^{13}C (100 MHz CDCl_3) de CIH-13Ac	139
69. Espectro HSQC de CIH-13Ac	140
70. Espectro HMBC de CIH-13Ac	141
71. Estructura de 2-(2'-hidroxidecanoil amino)-1,3,4-hexadecanotriol-8-eno (CIH-15)	142
72. Espectro RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de 2-(2'-hidroxidecanoil amino)-1,3,4-hexadecanotriol-8-eno (CIH-15)	145

73. Espectro RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de 2-(2'-hidroxidecanoil amino)-1,3,4-hexadecanotriol-8-eno (CIH-15)	146
74. Cromatograma de Gases de CIH-15	147
75. Espectro EM-IE de CIH-15	147
76. Fragmentaciones más importantes de CIH-15	147
77. Espectro HRMS-ESI de CIH-15	148
78. Estructura de 2-(2'-acetoxidecanoil amino)-1,3,4-hexadecanotriacetat-8-eno (CIH-15Ac)	149
79. Espectro RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de 2-(2'-acetoxidecanoil amino)-1,3,4-hexadecanotriacetat-8-eno (CIH-15Ac)	152
80. Espectro COSY de 2-(2'-acetoxidecanoil amino)-1,3,4-hexadecanotriacetat-8-eno (CIH-15Ac)	153
81. Espectro RMN ^{13}C (100 MHz CDCl_3) de 2-(2'-acetoxidecanoil amino)-1,3,4-hexadecanotriacetat-8-eno (CIH-15Ac)	154
82. Espectro HSQC de 2-(2'-acetoxidecanoil amino)-1,3,4-hexadecanotriacetat-8-eno (CIH-15Ac)	155
83. Espectro HMBC de 2-(2'-acetoxidecanoil amino)-1,3,4-hexadecanotriacetat-8-eno (CIH-15Ac)	156
84. Estructuras químicas de los compuestos identificados en CIH-10	158
85. Espectro IR de CIH-10	159
86. Espectro RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de CIH-10	165
87. Espectro COSY de CIH-10	166
88. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de CIH-10	167
89. Espectro HSQC de CIH-10	168
90. Espectro HMBC de CIH-10	169
91. Espectro NOESY de CIH-10	170
92. Cromatograma de UPLC-QToF-MS de CIH-10	170
93. Espectro HRMS-ESI de CIH-10-I	171
94. Espectro HRMS-ESI de CIH-10-II	172
95. Espectro HRMS-ESI de CIH-10-III	173
96. Espectro HRMS-ESI de CIH-10-IV	174
97. Espectro HRMS-ESI de CIH-10-V	175
98. Esquema general de la reacción de metanólisis	176
99. Estructuras de los compuestos identificados en CIH-10Ac	177
100. Espectro RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de CIH-10Ac	181
101. Espectro COSY de CIH-10Ac	182
102. Espectro ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de CIH-10Ac	183
103. Espectro HSQC de CIH-10Ac	184
104. Espectro HMBC de CIH-10Ac	185
105. Imagen de docking ceramida- <i>E. coli</i> (1t8z)	211
106. Imagen de docking ceramida- <i>K. pneumoniae</i> (4osg)	212
107. Imagen de docking ceramida- <i>P. aeruginosa</i> (3mom)	213
108. Eflujo de ANTS-DPX inducido por la acción de CIH-13	215
109. CIH-13 induce un eflujo concentración-dependiente de solutos encapsulados en LUVs	215

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Antibióticos, modo de acción y mecanismos de resistencia	7
2. Lista de patógenos prioritarios para la Investigación y Desarrollo de nuevos antibióticos publicada por la OMS	12
3. Fármacos antituberculosos y sus mecanismos de acción	15
4. Actividades farmacológicas de algunos extractos del género <i>Cissus</i>	28
5. Actividades farmacológicas de compuestos aislados y caracterizados del género <i>Cissus</i>	29
6. Fracciones del extracto cloroformo/metanol	38
7. Propiedades de los compuestos acetilados	42
8. Aislados clínicos de bacterias farmacorresistentes utilizados en el proyecto	45
9. MRN _s incluidas en este trabajo, ejemplos seleccionados	53
10. Compuestos identificados del extracto hexánico por CG-EM	61
11. Compuestos identificados por CG-EM de CIH-1	65
12. Compuestos identificados por CG-EM de CIH-3	68
13. Comparación de datos espectroscópicos de CIH-7 con monoglicerol de <i>I. sonorae</i>	74
14. Datos espectroscópicos de β - sitosterol, estigmasterol y CIH-2	83
15. Comparación de datos espectroscópicos de CIH-8 con β -D-glucopiranosido de β -sitosterol aislado de <i>Lannea Kerstingii</i>	91
16. Comparación de datos espectroscópicos de CIH-8Ac con análogo reportado	94
17. Resultados de CG-EM de la muestra CIH-5Ac	103
18. Comparación de datos espectroscópicos de CIH-11 con 3-O- β -D-glucopiranosido de α -amirina aislado de <i>Dryopteris wallichiana</i>	106
19. Datos espectroscópicos RMN ¹ H de ceramidas sintética y naturales	132
20. Comparación de datos espectroscópicos de CIH-13 con ceramida aislada de <i>Cordia platythyrsa</i>	132
21. Comparación de datos espectroscópicos de CIH-13Ac con análogo acetilado	136
22. Datos espectroscópicos de RMN ¹ H de ceramidas sintética y naturales	148
23. Comparación de datos espectroscópicos de CIH-15 con ceramida natural	148
24. Comparación de datos espectroscópicos de CIH-15Ac con análogo acetilado	157
25. Comparación de datos espectroscópicos entre esqueleto de CIH-10 y el de una ceramida natural	176
26. Datos espectroscópicos de ¹³ C de CIH-10, esfingolípidos sintético y naturales	177
27. Comparación de datos espectroscópicos de CIH-10Ac y derivado acetilado de esfingolípido natural	186

28.	Actividad antibacteriana y antimicobacteriana de extractos y compuestos caracterizados de las hojas de <i>C. incisa</i>	188
29.	Resultados de citotoxicidad de los extractos de las hojas de <i>C. incisa</i>	196
30.	Compuestos con actividad biológica identificados en extracto hexánico de las hojas de <i>C. incisa</i>	197
31.	Actividad citotóxica de productos naturales y derivados semisintéticos de las hojas de <i>C. incisa</i> .	202
32.	Resultados del modelo y variables de entrada analizadas	205
33.	Algunos resultados del modelo predictivo para la ceramida en estudio	208
34.	Interacciones destacables ligando-proteína para <i>E. coli</i>	210
35.	Interacciones destacables ligando-proteína para <i>K. pneumoniae</i>	211
36.	Interacciones destacables ligando-proteína para <i>P. aeruginosa</i>	212
37.	Interacciones destacables ligando-proteína para <i>A. baumannii</i>	213

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANTS	Ácido 8-aminonaftalen-1, 3, 6-trisulfónico
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
BLEE	Beta-lactamasas de espectro extendido
CC	Cromatografía en Columna
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CG-EM	Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas
CHCl ₃	Cloroformo
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOPC	1,2-di-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina
DPX	bromuro de p-xileno-bispiridinio
EA	Energía de afinidad
EUA	Estados Unidos de América
FM	Fase Móvil
Hex	Hexano
UPLC-	Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento acoplado a Espectrometría de
QToF-MS	Masas-Quadropolo Tiempo de Vuelo
IC ₅₀	Concentración inhibitoria 50
IF	Fusión de la información (del inglés <i>Information Fusion</i>)
IRA	Infecciones respiratorias agudas
IS	Índice de selectividad
LUV	Vesículas unilamelares grandes (del inglés <i>Large Unilamellar Vesicles</i>)
MeOH	Metanol
MLV	Vesículas multilamelares (del inglés <i>MultiLamellar Vesicles</i>)
MRN	Red de reacción metabólica (del inglés <i>Metabolic Reaction Network</i>)
OADC	Ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
PABA	Ácido p-aminobenzoico
PTMLIF	Teoría de la perturbación con aprendizaje automático y fusión de información (del inglés <i>Perturbation-Theory Machine-Learning and Information Fusion</i>)
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
t _R	Tiempo de retención
TB-MFR	Tuberculosis multifarmacorresistente
TB-UFR	Tuberculosis ultrafarmacorresistente
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedades Infecciosas

A principios del siglo XXI, las enfermedades infecciosas siguen siendo una de las causas más importantes de muerte en la humanidad, aunque su contribución relativa ha ido disminuyendo desde el siglo XIX.¹ Estas enfermedades pueden transmitirse, directa o indirectamente de una persona a otra, lo cual ocurre a través de la piel o las superficies mucosas internas de las vías respiratorias, gastrointestinales y urogenitales.²

Los agentes causantes de las enfermedades infecciosas se dividen en cinco grupos: virus, bacterias, hongos, protozoos y helmintos. Las enfermedades infecciosas derivan su importancia del tipo y la extensión del daño que sus agentes causales infligen en los órganos y/o sistemas cuando ingresan a un huésped. El daño a los tejidos se debe a los procesos metabólicos de los agentes infecciosos intracelulares o dentro de los fluidos corporales, con la producción y liberación de toxinas o enzimas que interfieren con las funciones normales de los órganos y/o sistemas. Estos productos pueden distribuirse y causar daños de tal manera que el patógeno invade más órganos y/o sistemas.^{2,3}

El sistema inmunológico combate los agentes infecciosos y los elimina. La enfermedad infecciosa resulta o emerge en los casos en que dicho sistema no logra eliminar los agentes infecciosos patógenos.³

Estas enfermedades infecciosas se caracterizan por la aparición de distintos síntomas entre los que se pueden mencionar fiebre, malestar general, decaimiento, entre otros. Toda enfermedad infecciosa pasa por tres etapas: un período de incubación, período de desarrollo, que es donde aparecen los síntomas característicos, y por último, la convalecencia.⁴

Seis enfermedades infecciosas (la neumonía, la tuberculosis, las enfermedades diarreicas, el paludismo, el sarampión y el VIH/SIDA) provocan más de la mitad de todas las defunciones prematuras, causando sobre todo la muerte de niños y adultos jóvenes.⁵

1.1.1 Infecciones causadas por bacterias

Las bacterias son microorganismos con una capacidad extraordinaria de adaptación a diferentes condiciones ambientales. La capacidad infecciosa de las bacterias patógenas radica en que poseen la información genética necesaria para colonizar los tejidos del huésped, invadirlos y/o producir sustancias tóxicas que causarán la enfermedad.⁶

Las bacterias son las causantes de las infecciones respiratorias más comunes; los principales géneros involucrados varían, en función del tipo de cuadro respiratorio y del grupo etario involucrado.⁷

En la neumonía adquirida en la comunidad se ha reportado que los principales microorganismos asociados son: *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*) y *Legionella sp.* Cuando se analizan poblaciones cerradas, como campos militares y escuelas, el *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) es el agente causal más frecuente de brotes de neumonía. Por otro lado, si bien *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *S. pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) son causas poco frecuentes de neumonías en adultos, excepto cuando van

acompañadas de epidemias por virus de la influenza, estos microorganismos se observan con mayor frecuencia en infecciones del tracto respiratorio inferior de niños. En las poblaciones de pacientes hospitalizados, *S. aureus* y los bacilos Gram-negativos aerobios son una causa común de neumonía.⁷

Numerosas infecciones bacterianas pueden persistir en el huésped durante largos períodos de tiempo a pesar del tratamiento con antibióticos. Esta persistencia es una preocupación médica importante, ya que conduce al uso excesivo de antibióticos y, por lo tanto, contribuye a la resistencia a los antimicrobianos.⁸

1.1.2 Infecciones nosocomiales

Cada año, el tratamiento y la atención de cientos de millones de pacientes en todo el mundo se complica a causa de infecciones contraídas durante la asistencia médica. Como consecuencia, algunas personas se enferman más gravemente que si no se hubieran infectado. Algunas deben permanecer más tiempo en el hospital, otras quedan incapacitadas por un largo período, y otras mueren. Además del costo en vidas humanas, esta situación genera una carga económica adicional importante para los sistemas de salud. Las infecciones hospitalarias o nosocomiales están relacionadas con la atención sanitaria y constituyen un problema importante de seguridad del paciente.⁹

Una infección nosocomial puede definirse por una de las siguientes formas: infección contraída en el hospital por un paciente internado por una razón distinta de esa infección ó aquella que se presenta en un paciente internado en un hospital o en otro establecimiento de atención de salud en quien la infección no se había manifestado ni estaba en período de incubación en el momento del internado. Comprende también las infecciones

contraídas en el hospital, pero manifiestas después del alta hospitalaria y también las infecciones ocupacionales del personal del establecimiento.¹⁰

Las infecciones nosocomiales ocurren más frecuentemente en las heridas quirúrgicas, las vías urinarias y las vías respiratorias inferiores.¹¹

Las bacterias que causan el mayor número de infecciones en las vías respiratorias en hospitales son: *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *S. aureus*. Las infecciones con estas bacterias complican las condiciones clínicas del paciente y están asociadas con una alta morbilidad y mortalidad.⁹

Otro de los factores a tener en cuenta es el costo que generan estas patologías. Se estima que las infecciones nosocomiales en Inglaterra generan un costo de 1000 millones de libras por año. En los Estados Unidos de América (EUA), la cifra es entre 4500 a 5700 millones de dólares americanos. En México, el costo anual se aproxima a los 1500 millones de pesos.^{9,12}

Los datos de la Red Nacional de Seguridad Sanitaria de EUA indican que las bacterias Gram-negativas son responsables de más del 30% de las infecciones adquiridas en el hospital. Una variedad de organismos Gram-negativos son responsables de estas infecciones nosocomiales, siendo la familia Enterobacteriaceae el grupo más identificado en general.^{13,14}

Las infecciones causadas por bacterias Gram-negativas tienen características que son especialmente preocupantes. Estos organismos son altamente eficientes en la adquisición de genes que codifican mecanismos de resistencia a los antibióticos. Además, disponen de una gran cantidad de mecanismos de resistencia, ya sea contra el mismo antibiótico o utilizando un solo mecanismo para afectar a múltiples antibióticos.¹⁴

1.1.3 Epidemiología de las infecciones bacterianas

De acuerdo a las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS), las infecciones de las vías respiratorias inferiores continúan siendo la enfermedad transmisible más letal; en 2016 causaron tres millones de defunciones en todo el mundo.¹⁵

En México, hasta el año 2014, las principales causas de morbilidad fueron las enfermedades infecciosas, los tres primeros lugares como causa de morbilidad fueron ocupados por las Infecciones Respiratorias Agudas (IRA), las infecciones intestinales y la infección de vías urinarias. Según las estadísticas oficiales, en este país las IRA constituyen la primera causa de morbilidad e ingreso hospitalario en los menores de 5 años.^{12,16}

En relación a las infecciones nosocomiales, más de 1.4 millones de personas de todo el mundo contraen infecciones en el hospital en todo momento. Como se mencionó anteriormente, estas infecciones desencadenan una mayor resistencia de los microorganismos a los fármacos antimicrobianos, además son responsables de la prolongación de las estancias hospitalarias, de enormes costos adicionales para los sistemas de salud, de elevados costos para los pacientes y sus familias, incluso de muertes innecesarias.¹⁷

En México, el control de infecciones nosocomiales se formaliza a partir del programa establecido en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, que se extiende a los otros Institutos Nacionales de Salud y desde donde surge la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica. Se calcula que en este país 450 000 casos de infecciones relacionadas con la atención sanitaria causan 32 muertes por cada 100 000 habitantes por año.¹²

1.1.4 Tratamiento de las enfermedades infecciosas bacterianas

Para combatir a los agentes patógenos causantes de estas enfermedades infecciosas, se cuenta con una amplia gama de antibióticos con diversos mecanismos de acción y efectividad probada¹⁸ (Tabla 1), aunque en la mayoría de los casos se inicia con un “tratamiento empírico” donde se desconoce al agente etiológico y/o su sensibilidad antimicrobiana.¹⁹

La finalidad del tratamiento con antimicrobianos es seleccionar un medicamento con actividad selectiva contra los agentes patógenos más probables y con menos posibilidades de causar efectos adversos o de promover la resistencia. Debido a su estructura y grado de afinidad con los sitios objetivo, se clasifican en: betalactámicos, glucopéptidos, antimetabolitos, tetraciclinas, quinolonas, aminoglucósidos, cloranfenicol, macrólidos, lincosamida, estreptograminas y oxazolidinonas.²⁰

Los antibióticos han salvado millones de vidas, pero además han supuesto una revolución en la medicina. Sin embargo, desde hace algunos años, una amenaza creciente deteriora la eficacia de estos fármacos: la resistencia bacteriana.¹

TABLA 1 Antibióticos, modo de acción y mecanismos de resistencia¹⁸

Familia	Mecanismos de acción	Fármacos	Mecanismos de resistencia
Betalactámicos	Inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana	Penicilinas G y V, Metilicina, Oxacilina, Nafcilina, Ampicilina, Amoxicilina, Carbenicilina, Ticarcilina, Piperacilina, Mezlocilina	Producción de β -lactamasas, como las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), enzimas mediadas por plásmidos AmpC, y β -lactamasas que hidrolizan los carbapenems (carbapenemasas), y mediante la producción de genes BLEE (blaCTX-M, blaTEM, blaSHV)
		Carbapénemicos: Imipenem, Meropenem, Doripenem, Ertapenem	La resistencia a los carbapenems en algunas especies es intrínseca. Como en metalo- β -lactamasa (MBL) L1. En bacterias clínicamente importantes, la resistencia al carbapenem se adquiere mediante eventos mutacionales o la adquisición de genes mediante la transferencia horizontal. Bomba tripartita de eflujo, sobreexpresión de resistencia de bombas de eflujo mediada por enzimas (β -lactamasas, carbapenemasas)
		Monobactámicos: Aztreonam	
		Inhibidores de las Betalactamasas: Ácido Clavulánico, Sulbactam, Tazobactam Cefalosporinas: 1ª generación: Cefalexina, Cefalotina 2ª generación: Cefaclor, Cefuroxima, Cefoxitina 3ª generación: Cefotaxima, Ceftriaxona, Ceftazidima	El mecanismo más frecuente de resistencia a las cefalosporinas es su destrucción por hidrólisis del anillo β -lactámico.

TABLA 1. Antibióticos, modo de acción y mecanismos de resistencia (Continuación)

Familia	Mecanismos de acción	Fármacos	Mecanismos de resistencia
Glucopéptidos	Inhiben la síntesis de la pared celular en bacterias Gram-positivas.	Vancomicina, Teicoplanina	Cinco fenotipos resistentes a Vancomicina (VanA-E), originados en enterobacterias resistentes a vancomicina (ERV). Resistencia mediada por eflujo, bombas de eflujo AcrF causan resistencia.
Antimetabolitos: Sulfonamidas y Trimetoprim	Evitan el uso bacteriano normal de ácido p-aminobenzoico (PABA) para la síntesis de ácido fólico (ácido pteroilglutámico). Inhiben la dihidropteroato sintasa, enzima bacteriana que provoca la incorporación del PABA en el ácido dihidropteroico, precursor inmediato del ácido fólico.	Sulfacetamida, Sulfanilamida, Sulfadiazina, Sulfametoxazol, Sulfisoxazol	Modificaciones enzimáticas de la célula bacteriana: menor afinidad de la dihidropteroato sintasa por las sulfonamidas, permeabilidad bacteriana reducida o la salida activa del fármaco, una vía metabólica alterna para la síntesis de un metabolito esencial ó mayor producción de un metabolito esencial o antagonista del fármaco.
Tetraciclinas	Inhiben la síntesis de proteínas de la bacteria al ligarse al ribosoma bacteriano 30 S y evitan la llegada del aminoacil ARNt al sitio aceptor en el complejo ARNm ribosomal.	Clortetraciclina, Oxitetraciclina, Demeclociclina, Doxyciclina, Minociclina	La resistencia a las tetraciclinas se debe con mayor frecuencia a las bombas de flujo de salida ABC o por modificación ribosomal. También se ha reportado una enzima inactivadora de tetraciclinas, TetX.

TABLA 1. Antibióticos, modo de acción y mecanismos de resistencia (Continuación)

Familia	Mecanismos de acción	Fármacos	Mecanismos de resistencia
Quinolonas	Inhiben el superenrollamiento del ADN mediado por la girasa.	1ª generación: Ácido Nalidíxico 2ª generación: Ciprofloxacina, Levofloxacina, Ofloxacina 3ª generación: Esfarfloxacina, Gatifloxacina	La resistencia por modificación de la diana ocurre comúnmente por mutaciones en los genes <i>gyrA</i> y el gen <i>qnrA</i> mediado por el plásmido <i>parC</i> . Las bombas de eflujo de fluoroquinolonas, que pueden ser intrínsecas o adquiridas, comúnmente muestran una amplia actividad.
Aminoglucósidos	Se unen a la subunidad ribosómica 30S e interfieren en el comienzo de la síntesis proteica. El aminoglucósido que se liga a la subunidad 30S también ocasiona lectura errónea de ARNm, lo cual produce una proteína sintetizada en forma incompleta o incorporación de aminoácidos incorrectos que culmina en la producción de proteínas anormales o no funcionales.	Gentamicina, Amikacina, Tobramicina, Netilmicina, Estreptomicina, Neomicina, Kanamicina	Poca penetración intracelular del antibiótico, inactivación del fármaco por las enzimas microbianas o la escasa afinidad del fármaco por el ribosoma bacteriano.
Cloranfenicol	Inhibe la síntesis proteínica. Se une reversiblemente a la subunidad ribosómica 50S (cerca del sitio de unión de los macrólidos y la clindamicina, los cuales inhiben el cloranfenicol en forma competitiva).		Depende de la acetiltransferasa codificada en plásmido que inactiva el fármaco. También es consecuencia de la menor permeabilidad y de la mutación ribosómica

TABLA 1 Antibióticos, modo de acción y mecanismos de resistencia (Continuación)

Familia	Mecanismos de acción	Fármacos	Mecanismos de resistencia
Macrólidos	Son fármacos bacteriostáticos que inhiben la síntesis proteínica al unirse de manera reversible a las subunidades ribosómicas 50S de microorganismos sensibles en el sitio en que se unen a cloranfenicol o en un punto muy cercano	Eritromicina, Claritromicina, Azitromicina	<ul style="list-style-type: none"> • Salida del fármaco por bombeo activo (codificado por <i>mrsA</i>, <i>mefA</i> o <i>mefE</i> en los estafilococos, en los estreptococos del grupo A o en <i>S. pneumoniae</i>) • Protección ribosómica por la producción inducible o constitutiva de las enzimas metilasas, mediada por la expresión de <i>ermA</i>, <i>ermB</i> y <i>ermC</i> que modifican el punto ribosómico de acción y disminuyen la unión con el fármaco. • Hidrólisis de macrólidos por esterases producidos por la familia Enterobacteriaceae. • Mutaciones cromosómicas que alteran la proteína ribosómica 50S (en <i>B. subtilis</i>, especies de <i>Campylobacter</i>, micobacterias y cocos gram-positivos)
Lincosamida	Se une a la subunidad 50S de los ribosomas bacterianos y suprime la síntesis de proteínas	Clindamicina	La resistencia a macrólidos proveniente de la metilación ribosómica de enzimas codificadas por <i>erm</i> también puede generar resistencia a la Clindamicina. La misma no es sustrato para las bombas de salida de macrólido.
Estreptograminas	Inhibe la síntesis proteínica al combinarse irreversiblemente al ribosoma 50S	Quinopristina/Dalfopristina	La resistencia a Quinopristina/Dalfopristina siempre se asocia a un gen de resistencia para las Estreptograminas de tipo A. Impidiendo la unión del fármaco a su sitio de acción.
Oxazolidinonas	Inhibe la síntesis de proteínas al unirse al sitio P de la subunidad ribosómica 50S	Linezolid	La resistencia en caso de enterococos y estafilococos proviene de mutaciones puntuales del ARNr en 23S.

1.1.5 Resistencia bacteriana

La resistencia bacteriana se puede definir como la capacidad de una bacteria para sobrevivir en concentraciones de antibiótico que inhiben/matan a otras de la misma especie. El uso inapropiado de antibióticos, las prescripciones médicas empíricas por la falta de pruebas diagnósticas rápidas y fiables, el uso generalizado de antimicrobianos para tratamiento o profilaxis, el poco apego a la prescripción, son factores contribuyentes a la resistencia bacteriana.¹

Los organismos multifármacorresistentes han surgido no sólo en el entorno hospitalario, sino que ahora se identifican a menudo en entornos comunitarios, lo que sugiere que existen reservorios de bacterias resistentes a los antibióticos fuera del hospital.²¹

Como parte de las actividades de la OMS para combatir el creciente problema mundial de la resistencia a los antimicrobianos, en Febrero de 2017, se publica la primera lista de «patógenos prioritarios» resistentes a los antibióticos, en la que se incluyen las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana.²²

La lista se ha elaborado para tratar de guiar y promover la Investigación y Desarrollo (I+D) de nuevos antibióticos, en la misma se pone de relieve especialmente la amenaza que suponen las bacterias Gram-negativas resistentes a múltiples antibióticos (Tabla 2).²²

TABLA 2. Lista de patógenos prioritarios para la Investigación y Desarrollo de nuevos antibióticos publicada por la OMS

Prioridad 1: CRÍTICA	
1	<i>A. baumannii</i> , resistente a carbapenémicos
2	<i>P. aeruginosa</i> , resistente a carbapenémicos
3	Enterobacteriaceae, resistentes a carbapenémicos, productoras de Beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE)
Prioridad 2: ELEVADA	
1	<i>E. faecium</i> , resistente a vancomicina
2	<i>S. aureus</i> , resistente a meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a vancomicina
4	<i>Helicobacter pylori</i> , resistente a claritromicina
5	<i>Campylobacter</i> spp., resistente a fluoroquinolonas
6	<i>Salmonella</i> spp., resistente a fluoroquinolonas
7	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , resistente a cefalosporinas, resistente a fluoroquinolonas
Prioridad 3: MEDIA	
1	<i>S. pneumoniae</i> , sin sensibilidad a la penicilina
2	<i>H. influenzae</i> , resistente a ampicilina
3	<i>Shigella</i> spp., resistente a fluoroquinolonas

1.1.5.1 Mecanismos de resistencia bacteriana

La respuesta bacteriana al “ataque” de los antibióticos es el mejor ejemplo de adaptación bacteriana y el pináculo de la evolución. La “supervivencia del más apto” es una consecuencia de una inmensa plasticidad genética de patógenos bacterianos que desencadenan respuestas específicas que resultan en adaptaciones mutacionales, adquisición de material genético o alteración de la expresión génica que produce resistencia a prácticamente todos los antibióticos actualmente disponibles en la práctica clínica.²¹

Las consecuencias del uso excesivo e imprudente de antibióticos, la diseminación generalizada de determinantes resistentes como parte de los elementos genéticos móviles (MGE, *por sus siglas en inglés*) ha aumentado la tasa de desarrollo de resistencia.²⁰

Desde el punto de vista molecular y bioquímico existen básicamente tres mecanismos por medio de los cuales una bacteria puede hacerse resistente al efecto del antibiótico, a saber: i) modificaciones de la molécula antimicrobiana, ii) prevención para alcanzar el objetivo del antibiótico (disminuyendo la penetración o extrusión activa del compuesto antimicrobiano), iii) cambios y/o derivación de sitios objetivo.^{21,23}

En años recientes, se han identificado siete mecanismos específicos de resistencia presentes en las bacterias Gram-negativas. Estos mecanismos incluyen, la pérdida de porinas, que reduce el movimiento del fármaco a través de la membrana celular; la presencia de β -lactamasas en el espacio periplásmico que degrada la β -lactama; aumento de la expresión de la bomba de flujo transmembrana, que expulsa el fármaco de la bacteria antes de que pueda tener un efecto; la presencia de enzimas modificadoras de antibióticos, que hacen que el antibiótico sea incapaz de interactuar con su objetivo; mutaciones en el sitio objetivo, que evitan que el antibiótico se una a su sitio de acción; mutaciones o modificaciones ribosómicas, que impiden que el antibiótico se una e inhiba la síntesis de proteínas; mecanismos de *bypass* metabólico, que utilizan una enzima resistente alternativa para evitar el efecto inhibitorio del antibiótico; y una mutación en el lipopolisacárido, que hace que la clase de antibióticos de polimixina no pueda unirse a este objetivo.¹⁴

1.1.6 Infecciones causadas por *Mycobacterium tuberculosis*

La tuberculosis (TB) es una infección bacteriana causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. Por lo general, afecta los pulmones (TB pulmonar), pero también puede

afectar otros sitios (TB extrapulmonar). La TB se disemina a través del aire, cuando una persona con TB pulmonar tose, estornuda o habla. Se trata de una infección curable y que se puede prevenir.²⁴

Se calcula que una cuarta parte de la población mundial padece tuberculosis latente, término aplicado a las personas infectadas por el bacilo pero que aún no han enfermado ni pueden transmitir la infección.²⁵ Las personas infectadas con el bacilo tuberculoso tienen un riesgo a lo largo de su vida de enfermarse de tuberculosis (5-15%). En cambio, las personas inmunodeprimidas, por ejemplo las que padecen VIH, desnutrición o diabetes, y los consumidores de tabaco corren un riesgo mucho mayor de enfermarse de TB.²⁵

1.1.6.1 Epidemiología y tratamiento de la Tuberculosis

En el “Global Tuberculosis Report 2018” se reconoce a la tuberculosis como una de las 10 principales causas de muerte a nivel mundial y la principal causa de un solo agente infeccioso (por encima del VIH/SIDA). En 2017, la TB causó un estimado de 1.3 millones de muertes entre las personas VIH negativas, y 300 000 muertes adicionales por TB entre las personas VIH positivas.²⁴ El referido reporte anuncia que millones de personas contraen la enfermedad cada año, afectando a todos los países y a todos los grupos de edad. Se estimaron además, 10 millones de casos nuevos de TB equivalente a 133 casos por cada 100 000 habitantes.²⁴

La enfermedad de tuberculosis se puede tratar tomando varios medicamentos durante un período de 6 a 9 meses. En la actualidad hay 10 medicamentos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, *por sus siglas en inglés*) para el tratamiento de esta enfermedad.²⁶ Los esquemas posológicos para su tratamiento tienen una fase inicial de 2 meses, seguida de la fase de continuación en la

que se eligen varias opciones de tratamiento, con una duración de 4 a 7 meses (para un total de 6 a 9 meses de tratamiento). A continuación se muestra la clasificación para los fármacos antituberculosos, así como sus mecanismos de acción.²⁷

TABLA 3. Fármacos antituberculosos y sus mecanismos de acción

Clasificación	Mecanismo de acción	Fármacos
Fármacos de primera línea	Inhibe la síntesis de ácidos micólicos de la pared celular a través de vías dependientes de oxígeno.	Isoniazida
	Inhibe al ácido ribonucleico (ARN) polimerasa dependiente de ácido desoxirribonucleico (ADN) de la micobacteria para formar un complejo enzima-fármaco estable que suprime el comienzo de la formación en cadena en la síntesis de ARN.	Rifampicina
	Disminuye los niveles óptimos de pH celular, inhibiendo así la ácido graso sintasa y el transporte de membrana.	Pirazinamida
	Inhibe la síntesis de proteínas uniéndose a un sitio activo de ARNr 16S en la subunidad ribosomal 30s.	Estreptomicina
	Inhibe la síntesis de arabinogalactanos y arabinomananos.	Etambutol
Fármacos de segunda línea	Inhibe la topoisomerasa bacteriana IV y la ADN girasa, enzimas que son requeridas para la transcripción, reparación y recombinación.	Ciprofloxacina
	Interfieren en la síntesis de proteínas bacterianas al unirse a la subunidad 30S de los ribosomas.	Capreomicina Kanamicina
	No ha sido descrito con exactitud su mecanismo, pero se ha comprobado que inhibe la síntesis de péptidos	Etionamida
	Es un antagonista del PABA e impide la utilización de este compuesto para la síntesis de ácido fólico.	Ácido <i>para</i> -aminosalicílico
	Inhibe la síntesis de pared celular.	Cicloserina

1.1.6.2 Tuberculosis multifarmacorresistente

La OMS considera a la tuberculosis multifarmacorresistente (TB-MFR) como una crisis de salud pública y una amenaza para la seguridad sanitaria. La farmacorresistencia surge debido a una mala utilización de los medicamentos antituberculosos, ya sea a través de su prescripción incorrecta por los dispensadores de atención de salud, por la mala calidad de los medicamentos o la interrupción prematura del tratamiento por los pacientes.²⁵

La TB-MFR es causada por una cepa que no responde al tratamiento con isoniazida ni rifampicina, los dos medicamentos antituberculosos de primera línea más eficaces de que se dispone. La forma multifarmacorresistente se puede tratar y curar con medicamentos de segunda línea. Sin embargo, las opciones de tratamiento de segunda línea son limitadas y requieren quimioterapia de larga duración (hasta dos años de tratamiento) con fármacos que además de caros, son tóxicos.

En algunos casos, se pueden alcanzar grados aún más preocupantes de farmacorresistencia. La tuberculosis ultrafarmacorresistente (TB-UFR) es una forma más grave de tuberculosis farmacorresistente causada por bacterias que no responden a los medicamentos antituberculosos de segunda línea, lo que deja a muchos pacientes sin otras opciones de tratamiento.²⁵

A nivel mundial, apenas el 54% de los enfermos con TB-MFR y el 30% de los enfermos con TB-UFR reciben actualmente un tratamiento eficaz. La OMS ha aprobado en 2016 el uso de un régimen normalizado de corta duración para enfermos con TB-MFR. Este régimen terapéutico, que varía entre los 9 y 12 meses, es mucho menos caro que los tratamientos convencionales contra la tuberculosis multifarmacorresistente que pueden durar hasta 2 años. Sin embargo, los pacientes con

TB-UFR no pueden utilizar este régimen y deberán seguir tratamientos más largos contra la tuberculosis multifarmacorresistente, a los que se podrían añadir uno de los nuevos fármacos (bedaquilina y delamanida).²⁵

1.2 Cáncer

«Cáncer» es un término genérico para un gran grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento de células anormales más allá de sus límites habituales que luego pueden invadir partes adyacentes del cuerpo y/o diseminarse a otros órganos. Otros términos comunes utilizados son tumores malignos y neoplasias. El cáncer puede afectar a casi cualquier parte del cuerpo y tiene muchos subtipos anatómicos y moleculares que requieren estrategias de manejo específicas. Se ha convertido en un importante problema de salud en las últimas décadas y actualmente es la segunda causa de muerte en todo el mundo.²⁸

El cáncer constituye una enorme carga para la sociedad en países desarrollados y subdesarrollados. La incidencia de cáncer está aumentando debido al crecimiento y el envejecimiento de la población, así como a la creciente prevalencia de factores de riesgo establecidos como el tabaquismo, el sobrepeso, la inactividad física y los cambios en los patrones reproductivos asociados con la urbanización y el desarrollo económico.²⁹

1.2.1 Epidemiología del cáncer

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial provocando 9.6 millones de muertes en 2018. A nivel mundial, aproximadamente 1 de cada 6 muertes se debe al cáncer. Entre los cánceres más comunes se encuentran: pulmón (2.09 millones de casos), mama (2.09 millones de casos), colorectal (1.80 millones de casos), próstata (1.28 millones de casos), piel (no melanoma) (1.04 millones de casos), y el de estómago (1.03 millones de casos).²⁸

Mientras que los cánceres de más alta mortalidad según el reporte de la OMS en el 2018 fueron: pulmón (1.76 millones), colorectal (862 000), estómago (783 000), hígado (782 000), y mama (627 000).²⁸

Las infecciones causantes de cáncer, como la hepatitis y el virus del papiloma humano (VPH), son responsables de hasta el 25% de los casos de cáncer en los países de ingresos económicos bajos y medios. En estos países la presentación tardía de los pacientes ante el médico, el diagnóstico y los tratamientos inaccesibles son comunes.²⁸

Las regiones con niveles más bajos de desarrollo, incluidos México, América Central y América del Sur, representan el 70% de las muertes por cáncer en todo el mundo.³⁰ Con la finalidad de ofrecer información del impacto de este padecimiento entre la población mexicana, el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) presenta anualmente un comunicado donde se abordan las principales causas de mortalidad por cáncer en diferentes grupos etarios. Según sus estadísticas, en México, los cinco principales tumores malignos en la población de 60 años y más, al cierre del 2016 fueron: de órganos digestivos, órganos genitales masculinos, órganos respiratorios e intratorácicos, órganos genitales femeninos y mama.³¹

Las muertes por cáncer en la edad adulta tienen un impacto significativo en la economía de los países. En México se realizó una estimación del costo en la productividad a causa del cáncer para 2020, obteniéndose una afectación de 12 120.91 millones de pesos por las muertes prematuras en la población económicamente activa. Lo cual convierte al cáncer en un serio problema de salud pública en este país.³¹

1.2.2 Tratamiento del cáncer y su problemática

El diagnóstico correcto del cáncer es esencial para un tratamiento adecuado y eficaz, porque cada tipo de cáncer necesita un tratamiento específico que puede abarcar una o más modalidades, las cuales se utilizan de acuerdo con los caracteres y etapas de los cánceres. Las modalidades de tratamiento son las siguientes: cirugía, quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, terapia hormonal, trasplantes de células madre, terapias dirigidas.³²

La quimioterapia actúa evitando que las células cancerosas crezcan y se dividan. Debido a que las células cancerosas en general crecen y se dividen más rápido que las células sanas, la quimioterapia las destruye más rápido que a la mayoría de las células sanas. Aunque el objetivo principal de los tratamientos contra el cáncer es matar las células cancerosas sin dañar las células normales, los tratamientos contra el cáncer tienen una eficacia limitada y ejercen sus acciones tanto en las células malignas como en las normales. Este daño causa los efectos secundarios que están relacionados con la quimioterapia. Por este motivo, se necesita el desarrollo de tratamientos eficaces que tengan actividad anticancerígena con menos efectos adversos.^{33, 34}

En total, un paciente con cáncer puede experimentar cualquier combinación de alrededor de 40 efectos secundarios específicos. Los efectos secundarios varían de una persona a otra, aún entre personas que reciben el mismo tratamiento. Médicos y científicos trabajan constantemente para desarrollar fármacos, combinaciones de fármacos y formas de administrar los tratamientos con menos cantidad de efectos secundarios.^{35,36}

Por otra parte, la aparición de resistencia a los medicamentos sigue siendo un problema importante en el tratamiento quimioterapéutico del cáncer. Los regímenes de tratamiento

actuales se están convirtiendo en ineficaces debido a la heterogeneidad tumoral y a una mayor resistencia a las drogas.³⁷

Entre las causas para la aparición de resistencia a la quimioterapia, se encuentran: alteración de los objetivos de los medicamentos, expresión de las bombas de eflujo de fármacos y expresión de los mecanismos de desintoxicación. La susceptibilidad reducida a la apoptosis y a la muerte celular, sustentan el desarrollo del cáncer y es un mecanismo de resistencia importante para las células cancerosas tanto para la quimioterapia como para los agentes que se dirigen a las vías de señalización.³⁸

Los cambios en el microentorno del tumor y la inmunidad local también pueden contribuir al desarrollo de la resistencia. Las células cancerosas pueden y usan varios de estos mecanismos al mismo tiempo, y al existir una considerable heterogeneidad entre los tumores, se requiere de un enfoque individualizado para el tratamiento del cáncer.³⁸

Para prevenir o retrasar la aparición de la multifármaco-resistencia (MFR) se utilizan combinaciones de múltiples agentes anticancerosos lo cual permite la reducción de la dosis del fármaco y proporciona una plataforma potencial para actuar simultáneamente en varios objetivos anticancerosos.³⁹

1.3 Las plantas como fuentes potenciales de fármacos

El estudio de los productos naturales en el descubrimiento de fármacos no es un concepto moderno. De hecho, muchas de las terapias médicas más exitosas se encontraron originalmente en la naturaleza. La investigación biomédica tiene una rica historia de descubrimiento basada en el uso de hierbas medicinales y prácticas de medicina tradicional. El Premio Nobel de Medicina 2015 se compartió por el descubrimiento de dos de estas terapias basadas en productos naturales, la artemisinina (antipalúdico) y la ivermectina (antiparásitario).⁴⁰

Los productos naturales y sus derivados han desempeñado un papel fundamental en el descubrimiento y desarrollo de las diferentes clases de antibióticos, a pesar de que estos han disminuido su presencia desde la década de los setentas. Los actuales agentes antibacterianos clínicos poseen similitudes estructurales que los hacen más susceptibles a los mecanismos de resistencia por las bacterias. Por lo tanto, la búsqueda de nuevos agentes antibacterianos derivados de las plantas, debe ser dirigida al descubrimiento de fuentes naturales de compuestos estructuralmente diversos y con mecanismos de acción distintos a los de los medicamentos comerciales.⁴¹

Desde hace 3500 años el hombre ha empleado las plantas para el tratamiento del cáncer y son más de 3000 especies las que se han reportado para el tratamiento de esta enfermedad. Las plantas son una fuente importante de sustancias anticancerosas y es significativo que de los 141 medicamentos contra el cáncer que existen en el mercado de EUA aproximadamente el 67% de éstos son de origen natural. Si consideramos que el 58% de las plantas empleadas en la medicina tradicional no han sido estudiadas, éstas representan al material inicial que puede conducir al descubrimiento de nuevos compuestos con actividad potencial anticancerosa.⁴²

En el descubrimiento de fármacos es necesario un enfoque multidisciplinario que implique la generación de una diversidad molecular verdaderamente novedosa a partir de fuentes de productos naturales, combinada con metodologías sintéticas totales y combinatorias e incluyendo la manipulación de rutas biosintéticas. De forma tal, que se brinde la mejor solución a la crisis de productividad actual frente a la comunidad científica comprometida en el descubrimiento y desarrollo de fármacos.⁴³

1.4 Estudios quimiinformáticos en la investigación y desarrollo de fármacos

Los altos costos asociados con el desarrollo de fármacos y la necesidad urgente de quimioterapias más eficientes contemplan el hecho de que los métodos computacionales pueden racionalizar varias etapas involucradas en este proceso.⁴⁴

La quimiinformática es una disciplina que se centra en extraer, procesar y extrapolar datos significativos de estructuras químicas. Con la rápida explosión de “grandes bases de datos químicos” (chemical ‘big’ data), y la síntesis combinatoria, el aprendizaje automático se ha convertido en una herramienta indispensable para que los diseñadores de medicamentos extraigan información química de grandes bases de datos de compuestos para diseñar medicamentos con mejores propiedades biológicas. Una de las principales áreas de aplicación para el aprendizaje automático en el descubrimiento de fármacos es ayudar a los investigadores a comprender y explotar las relaciones entre las estructuras químicas y sus actividades biológicas (SAR, *por sus siglas en inglés*).⁴⁵

El acoplamiento molecular (conocido como docking) es una técnica de mecánica molecular ampliamente utilizada para predecir energías y modos de enlace entre ligandos y proteínas, información de gran utilidad en el estudio de nuevos compuestos con efectos terapéuticos. El docking es usado para predecir la orientación del enlace de una molécula que será candidata a fármaco, con la proteína donde ejercerá su acción, con lo que se podrá predecir la afinidad y la actividad de la molécula. Y es por eso que este método tiene un rol muy importante en el diseño racional de fármacos. En estudios donde se aplica el acoplamiento molecular, usualmente se considera la mejor opción aquella que reporta la menor energía de unión.⁴⁶

Sin embargo, estos métodos tradicionales de diseño de medicamentos basados en interacciones ligando-proteína simples ya no son suficientes para cumplir con los criterios

clínicos de seguridad de medicamentos. En consecuencia, la incorporación de múltiples tipos y fuentes de datos, también conocidas como técnicas de “fusión de datos”, que agregan datos estructurales, genéticos y farmacológicos desde el nivel molecular al organismo, es crucial para el descubrimiento de fármacos más seguros y más eficaces.⁴⁵ De manera general se puede afirmar que la combinación de diferentes técnicas computacionales podría permitir realizar estudios más rigurosos y, por tanto, más reales a nivel molecular.⁴⁶

1.5 Sistemas modelo de membranas

La complejidad estructural y funcional de las membranas biológicas dificulta el estudio de sus componentes, lípidos y proteínas de membrana, así como la interacción de diferentes moléculas con la membrana. En las últimas décadas se han desarrollado diferentes sistemas modelo de membranas con objeto de simplificar el estudio de lípidos e interacciones de lípidos y proteínas. Existen diversos modelos de membrana como las monocapas, bicapas y liposomas.⁴⁷

1.5.1 Liposomas

Los liposomas son pequeñas vesículas artificiales de forma esférica que consisten en una o más bicapas de fosfolípidos y que pueden crearse a partir de colesterol y fosfolípidos naturales no tóxicos.⁴⁷(Figura 1). Los liposomas se describieron por primera vez a mediados de los años sesenta. Hoy en día, son una herramienta muy útil en varias disciplinas científicas. Los liposomas han sido el sistema modelo de membranas más utilizado para estudiar fenómenos biofísicos y bioquímicos básicos relacionados con las membranas celulares.

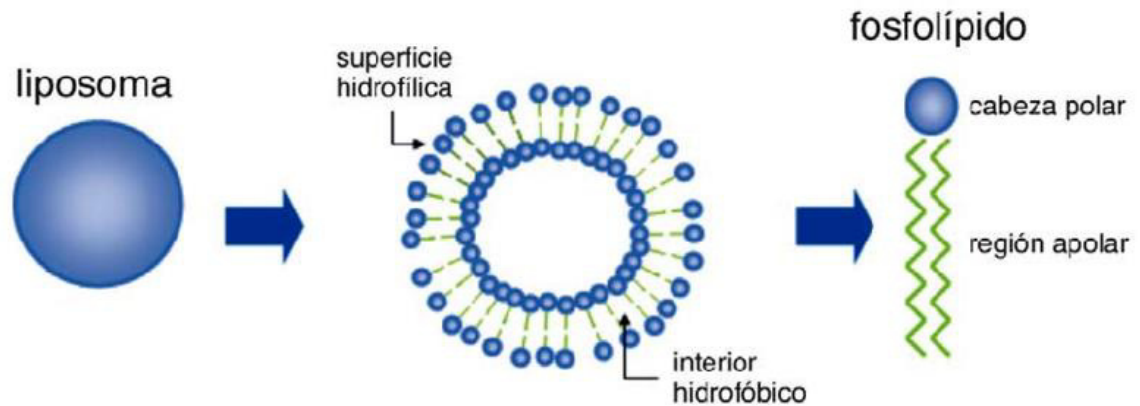


Figura 1. Naturaleza de un liposoma. (Imagen tomada de Díaz-Marcos⁴⁸)

Los diferentes tipos de liposomas se pueden clasificar de acuerdo a su tamaño en: vesículas unilamelares pequeñas (SUV, del inglés *Small Unilamellar Vesicles*), vesículas unilamelares grandes (LUV, del inglés *Large Unilamellar Vesicles*), vesículas multilamelares (MLV, del inglés *MultiLamellar Vesicles*) y vesículas unilamelares gigantes (GUV, del inglés *Giant Unilamellar Vesicles*).⁴⁹ (Figura 2)

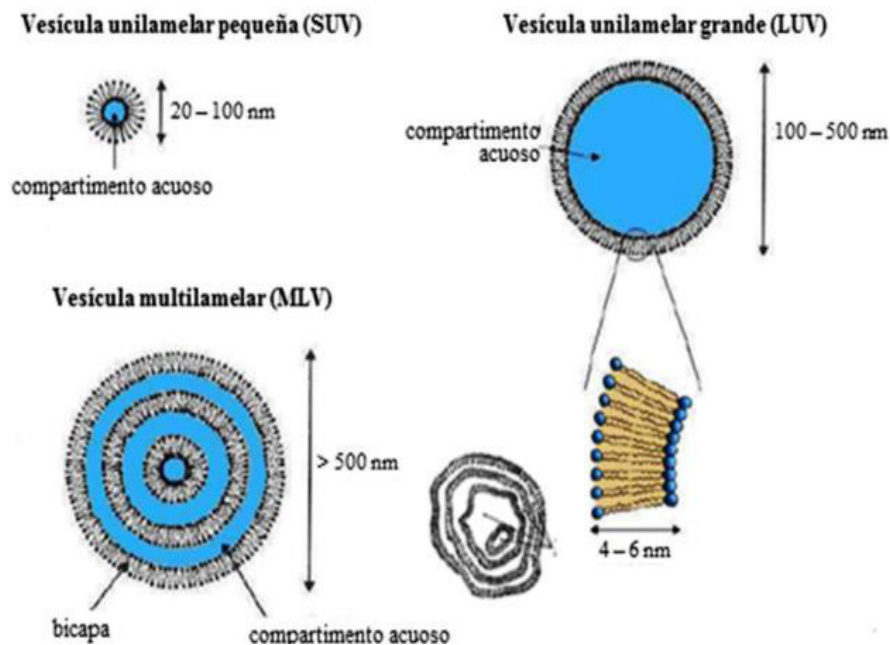


Figura 2. Tipos de liposomas⁴⁹

Los LUV son el tipo de liposomas más utilizados como membranas modelo. Tienen diámetros que oscilan entre 100 y 500 nm, con una distribución casi simétrica de los lípidos entre las dos hemicapas, 54% en la externa y 46 % en la interna. Además, la capacidad de encapsulación de solutos es alta. Estas características hacen que los LUV sean los liposomas más adecuados para estudiar las posibles interacciones de compuestos con membranas celulares.⁴⁹

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Medicina Tradicional en México

México cuenta con más de 60 pueblos indígenas que representan un 10% aproximadamente de la población total, es por eso que se reconoce como un país multiétnico y pluricultural, en el cual la medicina tradicional es un fenómeno de la cultura nacional que tiene características propias.⁵⁰

La medicina tradicional mexicana es un mosaico de piezas procedentes de culturas diferentes que han determinado históricamente el desarrollo de la cultura nacional. En múltiples ocasiones, la medicina tradicional ha representado la única opción de prevención y curación de enfermedades para los habitantes de las comunidades indígenas; esto debido principalmente al difícil acceso a las mismas y a la pobreza extrema en la que viven, así como la carencia de servicios de salud que los gobiernos no han podido garantizar.⁵⁰

México cuenta con una rica cultura en cuanto al uso de plantas para tratar enfermedades; sin embargo, según el investigador Peña Rodríguez del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) se calcula que menos de un dos por ciento de las plantas han sido estudiadas en lo relativo a su contenido fitoquímico y farmacológico.⁵¹ Las investigaciones realizadas desde el producto natural hasta la obtención de los agentes farmacoterapéuticos, pueden ser consideradas el ciclo más completo de una planta originalmente utilizada para tratar diversos padecimientos.⁵²

2.2 Género *Cissus*

Es alentador ver que recientemente, muchos investigadores están interesados en dar autenticación científica y explicación a las actividades biológicas de las plantas usadas en la medicina tradicional en todo el mundo. Uno de esos grupos de plantas que se usa en todos los continentes y está implicado para tratar diferentes dolencias es el género *Cissus* que pertenece a la familia de las Vitaceae.⁵³ Al género *Cissus* pertenecen aproximadamente 350 especies de las cuales, al menos una docena se usa globalmente en la medicina tradicional para tratar diferentes padecimientos. Algunos usos ejemplificados de especies de *Cissus* a lo largo del mundo se mencionan a continuación. Muchas culturas, tanto en el este como en el oeste de Asia, han utilizado especies de *Cissus* disponibles localmente para tratar varios problemas médicos; en China y el Lejano Oriente, se usa *C. assamica* como veneno anti-serpiente ya que disminuye la endotelina-1 y la sarafotoxina 6b, mientras que en el sudeste asiático, incluido el subcontinente indio y Sri Lanka, *C. quadrangularis* se usa para curar fracturas y como agente antiobesidad. Varios países de África usan diferentes especies de *Cissus* en sus prácticas medicinales tradicionales: la medicina tradicional de Camerún utiliza *C. aralioides* como agente antimicrobiano y toxicológico contra los microorganismos del tracto gastrointestinal y urogenital. En Nigeria, *C. ibuensis* se usa para tratar problemas gastrointestinales, reumatismo y artritis. En el Congo, *C. rubiginosa* se usa como agente anti-disentería y anti-diarreico. *C. rotundifolia* de África y Asia muestra propiedades antidiabéticas y antiparasitarias. En las islas del Caribe de Trinidad y Tobago, *C. verticillata* se usa como agente antidiabético y para tratar problemas urinarios. Los usos tradicionales más populares entre las especies son *C. quadrangularis* para la obesidad y enfermedades óseas y *C. sycoides* como agente antidiabético.⁵³

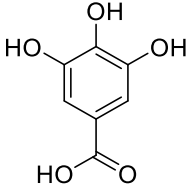
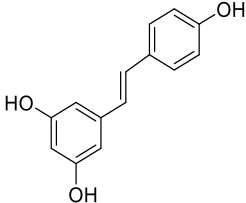
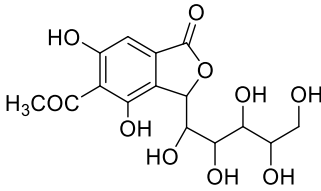
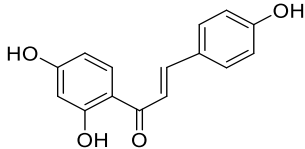
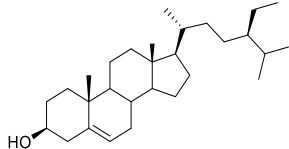
El género *Cissus* es amplio y diverso, y se han reportado en la literatura científica estudios químicos y farmacológicos de varias de sus especies. En la Tabla 4 se muestran actividades farmacológicas de algunos de los extractos de diferentes especies de *Cissus*. La Tabla 5, por su parte, contiene algunos de los compuestos aislados y caracterizados de diferentes especies del género *Cissus* y sus actividades farmacológicas.

Tabla 4. Actividades farmacológicas de algunos extractos del género *Cissus*

Planta	Parte estudiada	Tipo de extracto	Actividad farmacológica	Ref. ^a
<i>C. quadrangularis</i>	Toda la planta	Acetona/agua y metanol/agua	Actividad antibacteriana vs. Gram-negativas (<i>E.coli</i> y <i>P. aeruginosa</i>) y Gram-positivas (<i>S. aureus</i>)	54
<i>C. cornifolia</i>	Hojas y raíces	Etanol y agua	Actividad antidiabética. Actividad citotóxica en células embrionarias de riñón humano	55
<i>C. quadrangularis</i>	Toda la planta	Metanol, benceno, acetato de etilo	Actividad antibacteriana vs <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>E. coli</i>	56
<i>C. quadrangularis</i>	Tallos	Etanol y acetona	Actividad acaricida. Citotoxicidad en células Vero	57
<i>C. quadrangularis</i>	Hojas	Metanol	Actividad analgésica	58
<i>C. sicyoides</i>	Hojas	Etanol/agua	Actividad anti-inflamatoria y actividad anti-diarreica	59
<i>C. quadrangularis</i>	Toda la planta	Etanol	Actividad antibacteriana en aislados multi-resistentes de <i>Vibrio cholerae</i>	60

^a Ref: Referencia

Tabla 5. Actividades farmacológicas de compuestos aislados y caracterizados del género *Cissus*

Planta/parte	Compuesto aislado y caracterizado ^a	Actividad farmacológica	Ref. ^b
<i>C. pteroclada</i> / partes aéreas	<p>I</p>  <p>II</p> 	Actividad anti-inflamatoria	61
<i>C. cornifolia</i> / rizoma	<p>III</p> 	Actividad antimicrobiana vs <i>S. aureus</i> , <i>Salmonella typhi</i> , y <i>Candida albicans</i>	62
<i>C. polyantha</i> / tubérculo	<p>IV</p>  <p>V</p> 	Actividad anti-inflamatoria	63

^a(I) Ácido gálico, (II) Resveratrol, (III) (4,6-dihidroxi-5-metoxi-3-(1,2,3,4,5-pentahidroxipentil)-2-benzofuran-1(3H)-ona), (IV) Isoliquiritigenina, (V) β-sitosterol. ^bRef: Referencia.

2.2.1 *Cissus incisa*

Cissus incisa (Nutt.) Des Moul. Ex S. Watson. Nombre común: Hierba del buey.

Sinónimos: *Cissus trifoliata*, *Sicyos trifoliatus*. Familia: Vitaceae. Es una planta originaria del sur de los Estados Unidos y partes adyacentes del norte de México.

Es de rápido crecimiento, trepadora, con atractivas hojas verdes dentadas. Sus flores son blancas en verano, dando lugar a frutos negruzcos en otoño. Puede crecer en cualquier tipo de suelo que sea fértil y que no se inunde.^{64,65} (Figura 3) Según la medicina tradicional mexicana sus hojas sirven para tratar infecciones en la piel, abscesos, y tumores.⁶⁶ No existen reportes en la literatura científica sobre la composición química y propiedades farmacológicas de *C. incisa*, hasta este momento.



Figura 3. Hojas, frutos y flores de *C. incisa* (fotos⁶⁷)

2.3 Justificación

Dos serios problemas de salud pública mundial tienen alta incidencia y mortalidad: la resistencia de las bacterias a los antibióticos, y la resistencia de las células cancerígenas a la quimioterapia. Es por ello que nuestro estudio explora el potencial de los fitocompuestos aislados como futuros fármacos o plataformas para el tratamiento de estas enfermedades. Adicionalmente, la presente investigación pretende contribuir al conocimiento científico de la flora mexicana, pues hasta el momento no existe información validada de *C. incisa*. El estudio fitoquímico de esta especie, estaría justificando científicamente su uso en la medicina tradicional mexicana.

CAPÍTULO 3

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

Al menos uno de los constituyentes químicos de las hojas de *C. incisa* tendrá actividad antibacteriana o citotóxica. El compuesto más activo exhibirá un mecanismo de acción diferente al de los fármacos utilizados como referencia en este estudio. La actividad antibacteriana y/o citotóxica de los productos naturales de *C. incisa* justificará en parte el uso de la planta en la medicina tradicional mexicana.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo general

Aislar y caracterizar los constituyentes de las hojas de *C. incisa*, determinar su actividad antibacteriana, citotóxica y mecanismo de acción del compuesto más activo.

3.2.2 Objetivos específicos

1. Investigar bibliográficamente la especie vegetal a estudiar
2. Colectar la planta
3. Identificar botánicamente la especie vegetal
4. Secar y moler el material vegetal
5. Preparar los extractos hexánico, cloroformo/metanol y acuoso de la planta en estudio
6. Analizar el extracto hexánico por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
7. Fraccionar el extracto cloroformo/metanol
8. Aislar y purificar los fitocompuestos del extracto cloroformo/metanol
9. Caracterizar estructuralmente los fitocompuestos
10. Determinar la actividad antibacteriana de los productos naturales
11. Determinar la actividad citotóxica de los productos naturales
12. Elucidar el posible mecanismo de acción del compuesto más activo

CAPÍTULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales y equipos

4.1.1 Parte fitoquímica

Para la realización de cromatografías en columna (CC) se utilizaron como fase estacionaria: gel de sílice (SiO_2) marca EMD Chemicals Inc. con un tamaño de partícula 0.040-0.063 mm de Sigma Aldrich. Los disolventes empleados como fase móvil fueron hexano (Hex), cloroformo (CHCl_3), acetato de etilo (AcOEt), acetona y metanol (MeOH) grado reactivo marca Baker y diclorometano (DCM) grado reactivo marca Macron Chemicals.

Para la realización de cromatografía en capa fina (CCF) se utilizaron cromatofolios de gel de sílice 60 F254 de 20 x 20 cm sobre aluminio con un grosor de 0.2 mm marca Merck KGA. Como reveladores se usaron lámpara de UV marca Spectroline (λ 254 nm y 365 nm), solución de sulfato cérico en ácido sulfúrico. La determinación del punto de fusión se realizó en aparato Fischer-Johns. La elucidación estructural de los compuestos aislados se realizó por Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno y de Carbono trece (RMN ^1H y RMN ^{13}C) en el equipo de BRUKER NMR400 de 400 MHz utilizando disolventes deuterados y como referencia interna tetrametilsilano (TMS).

CG-EM se realizó en un cromatógrafo de Gases Agilent modelo 6890 con detector selectivo de masas por impacto electrónico (70eV) Agilent modelo 5973N.

La Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento acoplado a Espectrometría de Masas-Quadrupolo Tiempo de Vuelo (UPLC-QToF-MS) realizada en la UPV, se llevó a cabo

utilizando un sistema ACQUITY UPLC™ de Waters (Milford, MA, EUA), equipado con una bomba de suministro de disolvente binario, un inyector automático y un horno de columna. Todos los datos de espectrometría de masas se adquirieron en un SYNAPT G2 HDMS, con una configuración de cuadrupolo de tiempo de vuelo (Q-ToF) (Waters, Milford, MA, EUA) equipado con una fuente de ionización por electropulverización (ESI) que operaba en modo positivo.

Los datos de UPLC-QToF-MS realizada en la UAEM se obtuvieron con un equipo Agilent Technologies serie 1290 infinity II con fuente de iones ESI y detector modelo Q65F Agilent Technologies G6545 (Agilent, 5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, CA 95051, EUA).

4.1.2 Ensayos biológicos

Para la actividad antibacteriana se utilizó agua bidestilada, dimetilsulfóxido (DMSO) (J.T. Baker, EUA), incubadora INC-80 (Prendo), congelador -80°C (Panasonic), microplacas estériles de 96 pocillos de fondo redondo con tapa (Corning Costar, New York), y medio Mueller Hinton (Becton Dickinson).

Para la actividad antimicobacteriana se necesitaron microplacas estériles de 96 pocillos de fondo plano con tapa (Corning Costar, New York), medio Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), resazurina (Biotum, Hayward, CA), ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa (OADC; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), tween 80 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), glicerina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), tubos cónicos de 15 y 50 mL (Falcon, EUA).

Para la actividad citotóxica se utilizaron placas de 96 pocillos, las líneas celulares ensayadas fueron obtenidas de ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA), medio RPMI-1640 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), medio DMEM

(Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EUA) y suero bovino fetal (SFB, Invitrogen), kit de ensayo de proliferación de células de solución acuosa Cell Titer 96® (Promega, Madison, WI, EUA), lector ELISA automatizado.

4.1.3 Parte computacional

El modelo computacional predictivo se construyó utilizando las bases de datos disponibles en línea “ChEMBL” y “Protein Data Bank”. Para la realización del docking molecular se utilizaron los softwares AutoDockVina, Babel y AutoDock Tools scripts.

4.1.4 Ensayo de liberación de contenidos vesiculares

Para la preparación de los liposomas se necesitó un desecador a vacío, filtros de polycarbonato Nuclepore con un diámetro de poro de 100 nm, extrusor suministrado por Northern Lipids (Vancouver, BC, Canadá), osmómetro (Osmomat 030, Gonotec, Berlín, Alemania), espectrofotómetro UV-Vis Biomate-3. Los ensayos de liberación de los contenidos vesiculares se realizaron en un fluorímetro Fluoromax-3 (Horiba Jovin Yvon, Longjumeau Cedex, Francia). Ácido 8-aminonaftalen-1, 3, 6-trisulfónico (ANTS) y bromuro de p-xileno-bispiridinio (DPX) fueron suministrados por Avanti Polar Lipids (Canadá).

4.2 Estudio fitoquímico de las hojas de *Cissus incisa*

El estudio fitoquímico se realizó en el Laboratorio de Química de Productos Naturales y Sintéticos que se encuentra en la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

4.2.1 Material Vegetal

En este proyecto se utilizaron las hojas de *C. incisa*. Las partes aéreas de la planta fueron recolectadas en el municipio de Rayones, Nuevo León, México en el mes de octubre de 2016. El biólogo MC Mauricio González Ferrara, perteneciente a nuestro grupo de trabajo

realizó la identificación de la planta. Una muestra de referencia se depositó en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León obteniendo el número de voucher: 027499.

Las partes aéreas de la planta fueron secadas a la sombra durante siete días. Una vez secas, las hojas fueron separadas cuidadosamente de sus ramas, para ser molidas en un molino de cuchillas, obteniéndose 809 g de material vegetal seco y molido.

4.2.3 Preparación de extractos

Los extractos se prepararon por maceración de forma secuencial. El material vegetal se extrajo primero con hexano una vez (10000 mL), luego con cloroformo/metanol (1:1) siete veces (7000 mL), con frecuencia de cada 48 h. Finalmente con agua destilada una vez (1000 mL). Todos los extractos se filtraron por gravedad, luego al vacío y se concentraron en un evaporador rotativo, por separado, hasta obtener los extractos secos: 11.6 g de extracto hexánico y 84 g de CHCl₃/MeOH (1:1). En el caso del extracto acuoso se llevó a cabo una liofilización durante 72 h para obtener 19.6 g de extracto acuoso seco (Figura 4).

4.3 Análisis del extracto hexánico por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM)

El extracto hexánico fue analizado por CG-EM. Este análisis se realizó en la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM). Las condiciones instrumentales en las que se desarrolló la técnica fueron: columna (HP-5MS de 30 m x 0.250 mm x 0.25 microM), el gas acarreador fue helio (1 mL/min flujo constante), la temperatura inicial del horno fue 50°C, subiendo 2°C/min hasta 285°C para 35min (tiempo final), se utilizó un Detector Selectivo de Masas (MSD, *por sus siglas en inglés*)

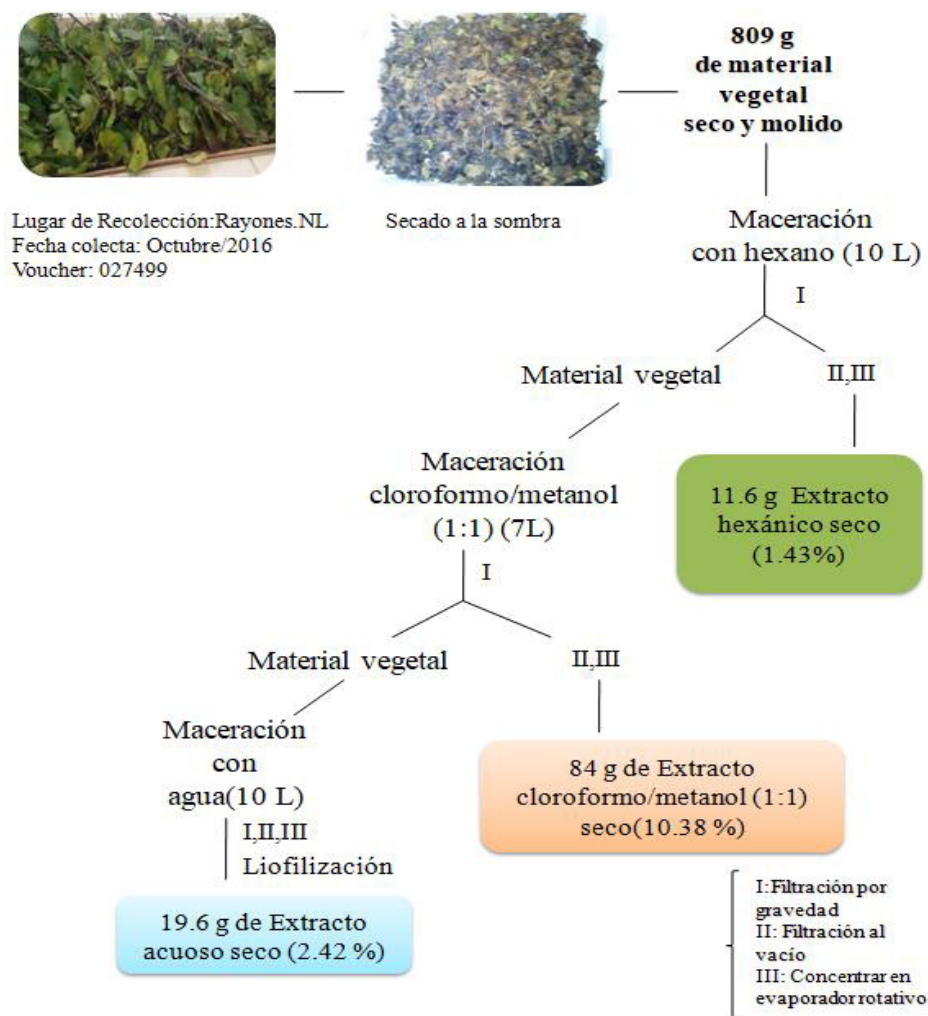


Figura 4. Diagrama de flujo de trabajo para la obtención de los extractos

4.4 Fraccionamiento del extracto cloroformo/metanol

El extracto cloroformo/metanol (84 g) se sometió a una cromatografía en columna (CC) usando como fase estacionaria (FE) gel de sílice (1680 g) y como fase móvil (FM), gradientes de hexano/acetato de etilo, acetato de etilo/metanol, obteniéndose un total de 403 fracciones. Las cuales fueron analizadas por cromatografía en capa fina observando bajo luz ultravioleta a 254 nm y 365 nm, y revelando con sulfato cérico. Las fracciones fueron agrupadas por similitud cromatográfica en 24 fracciones de la A-X, según se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Fracciones del extracto cloroformo/metanol

Fracción	Fase móvil	Fracciones reunidas
1-37	Hexano 100%	A
38-54	95:5 Hex/AcOEt	
55-61	90:10 Hex/AcOEt	B
62-65	90:10 Hex/AcOEt	C
66-80	90:10 Hex/AcOEt	D
81-86	85:15 Hex/AcOEt	
87-92	85:15 Hex/AcOEt	E
93-98	85:15 Hex/AcOEt	F
99-104	85:15 Hex/AcOEt	G
105-118	80:20 Hex/AcOEt	H
119-124	80:20 Hex/AcOEt	I
125-130	80:20 Hex/AcOEt	J
131-154	80:20 Hex/AcOEt	K
155-160	70:30 Hex/AcOEt	L
161-166	70:30 Hex/AcOEt	M
167-190	70:30 Hex/AcOEt	N
191-220	70:30 Hex/AcOEt	O
221-226	60:40 Hex/AcOEt	
227-232	60:40 Hex/AcOEt	P
233-250	50:50 Hex/AcOEt	Q
251-262	40:60 Hex/AcOEt	
263-300	15:85 Hex/AcOEt	R
301-330	100% AcOEt	S
331-342	90:10 AcOEt/MeOH	T
343-352	80:20 AcOEt/MeOH	U
353-360	80:20 AcOEt/MeOH	V
361-390	70:30 AcOEt/MeOH	W
391-402	50:50 AcOEt/MeOH	X
403	100% MeOH	

4.4.1 Aislamiento y purificación de los compuestos del extracto CHCl₃/MeOH

4.4.1.1 Aislamiento y purificación de CIH-1

De la fracción A (100% hexano y 95:5Hex/AcOEt), precipitó un sólido, el cual fue separado del sobrenadante por decantación y se dejó secar a temperatura ambiente. Se obtuvo un sólido de color blanco (**CIH-1**), con peso de 219.3 mg y rendimiento de 0.027 % respecto al peso total del material vegetal.

4.4.1.2 Aislamiento y purificación de CIH-3

De la fracción E Hex/AcOEt (85:15) se obtuvo un sólido (4g) que fue sometido a una CC en gel de sílice (80 g) y un gradiente de Hex/AcOEt. De la sub-fracción 19-36 Hex/AcOEt (90:10) se obtuvieron 6 mg (0.00074%) de un sólido amorfo color blanco que en CCF no reveló bajo luz UV, pero reveló con sulfato cérico como mancha de color café.

4.4.1.3 Aislamiento y purificación de CIH-5

De la fracción E Hex/AcOEt (85:15) se realizó una CC sobre gel de sílice (80g) y se eluyó con Hex/AcOEt en gradiente. Del análisis en CCF de las fracciones resultantes, se observó en la sub-fracción 37-42 Hex/AcOEt (80:20) un precipitado. Se procedió a lavarlo cuidadosamente con hexano y luego acetato de etilo para eliminar los pigmentos. Finalmente se obtuvo un sólido blanco (**CIH-5**), con un peso de 71.6 mg (0.0088 %). En CCF el sólido reveló de color morado con sulfato cérico.

4.4.1.4 Aislamiento y purificación de CIH-15

De la fracción E se obtuvo un sólido que luego fue sometido a CC con Hex/AcOEt en gradiente. La sub-fracción 37-46 (16.2 mg; Hex/AcOEt (80:20)) fue fraccionada en CC usando 729 mg de sílice y un gradiente de Hex/CH₂Cl₂/Acetona. De la sub-fracción 121-126 CH₂Cl₂/Acetona (96:4) precipitó un sólido blanco **CIH-15** (12.1 mg, 0.0015%).

4.4.1.5 Aislamiento y purificación de CIH-2

De la fracción H Hex/AcOEt (80:20) precipitó un sólido (**CIH-2**), el cual se sometió a varios lavados con acetona para eliminar los pigmentos. Se realizaron recristalizaciones con Hex/AcOEt (80:20), obteniéndose un sólido blanco amorfo con un peso de 332.1 mg (0.041%). El sólido en CCF no se observó bajo luz UV, pero reveló con sulfato cérico amoniacal dando color rojo-marrón.

4.4.1.6 Aislamiento y purificación de CIH-7

De la fracción O (1.1 g; Hex/AcOEt (70:30); Hex/AcOEt (60:40)) se realizó una CC usando gel de sílice (22g) y CH₂Cl₂/AcOEt en gradiente. De la sub-fracción 61-75 CH₂Cl₂/AcOEt (80:20), se obtuvo un sólido, el cual fue lavado con acetona para eliminar los pigmentos. Posteriormente se realizaron recrystalizaciones con la mezcla CH₂Cl₂/AcOEt (80:20) hasta obtener un sólido blanco (**CIH-7**), con peso de 18.9 mg (0.0023%). El sólido en CCF no se observó bajo la luz UV, tampoco reveló con sulfato cérico, pero reveló con vapores de yodo como una mancha de color café.

4.4.1.7 Aislamiento y purificación de CIH-8 y CIH-11

La fracción T (2.78 g; AcOEt/MeOH (90:10)) fue sometida a una columna cromatográfica sobre gel de sílice (55.48 g) con un gradiente de CHCl₃/MeOH. De las sub-fracciones 19-27, se observó un sólido que resultó ser una mezcla de compuestos. Para su purificación, una muestra de 4.12 g fue sometida a una CC con gel de sílice (164.94 g) y un gradiente de CHCl₃/MeOH. De la sub-fracción 79-90 CHCl₃/MeOH (82:18) precipitó un sólido color blanco amarillento, el cual fue lavado repetidamente con acetona hasta obtener 82 mg (0.01%) de un sólido blanco amorfo (**CIH-8**). En CCF el sólido no reveló bajo luz UV, pero reveló con sulfato cérico, dando color rojo-marrón. De las sub-fracciones 28-47 de la fracción T se obtuvo un sólido con impurezas, se procedió a lavarlo repetidamente con acetona y se purificó por recrystalización con cloroformo obteniéndose (32.7mg, 0.004%) de un sólido blanco (**CIH-11**) el cual no revela bajo luz UV, pero sí con sulfato cérico de color morado.

4.4.1.8 Aislamiento y purificación de CIH-10 y CIH-13

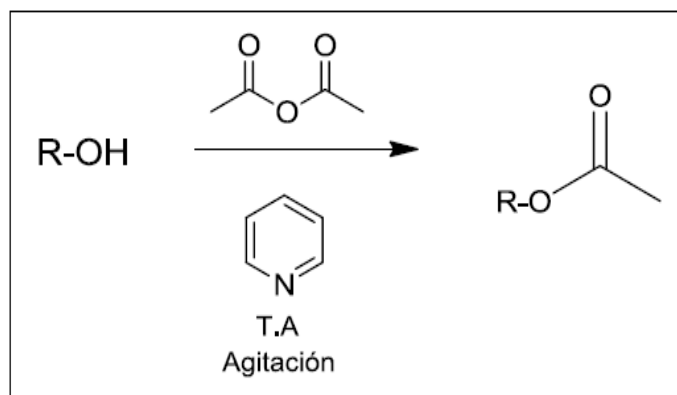
Se unieron las fracciones S y U por similitud cromatográfica dando 3.685 g de la mezcla. Posteriormente fue sometida a una CC en gel de sílice (110.55 g) y CH₂Cl₂/MeOH en

gradiente. De la sub-fracción 60-62 CH₂Cl₂/MeOH (89:11) se obtuvo un sólido, el cual fue sometido a varios lavados, primero con hexano y luego con acetona para eliminar los pigmentos. Finalmente se obtuvo un sólido de color amarillo-verdoso **CIH-13**, con un peso de 21.8 mg (0.0027%), el compuesto en CCF revela bajo la luz UV, y color café con sulfato cérico.

De las sub-fracciones 90-99 CH₂Cl₂/MeOH (80:20), CH₂Cl₂/MeOH (78:12) se obtuvo un precipitado, el cual fue lavado varias veces con acetona, obteniéndose un sólido de color pardo (**CIH-10**), con un peso de 294 mg (0.036 %). El sólido en CCF reveló bajo la luz UV 254 nm y 365 nm y como una mancha de color café con sulfato cérico.

4.5 Acetilación

Se realizó la acetilación de varios productos naturales, cada producto natural (16 mg) fue disuelto por separado con piridina (0.44 mL), en agitación y se adicionó anhídrido acético (0.56 mL), se dejó reaccionar a temperatura ambiente con agitación constante. El esquema general de dicha reacción se muestra en la Figura 5. Al término de cada reacción, la mezcla de reacción se pasó a un embudo de separación y se le agregaron 10 mL de AcOEt. Posteriormente se agregaron 10 mL HCl al 10 % y se agitó suavemente.



T.A = temperatura ambiente

Figura 5. Reacción general de acetilación

Una vez formadas las 2 fases, la fase acuosa es retirada y se recupera la fase orgánica. Este proceso se realizó tres veces. Un último lavado fue realizado, pero utilizando agua destilada. La fase orgánica recuperada se filtró sobre sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) para eliminar el agua, siendo concentrada finalmente en el evaporador rotativo. Las características de los compuestos acetilados obtenidos se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Propiedades de los compuestos acetilados

Propiedades Compuesto Acetilado	Aspecto físico	Puntos de fusión (°C)	Solubilidad	Rendimiento (%)
CIH-2Ac	Cristales en forma de aguja	110-115	CHCl_3	61.0
CIH-5Ac	Sólido blanco amorfo	142-147	CHCl_3	59.1
CIH-8Ac	Cristales en forma de aguja	144-146	CHCl_3	71.0
CIH-10Ac	Resina amarilla	-	CHCl_3	60.0
CIH-11Ac	Resina incolora	-	CHCl_3	83.6
CIH-13Ac	Sólido amorfo de color blanco-amarillento	55-57	CHCl_3	88.7
CIH-15Ac	Resina incolora	-	CHCl_3	65.0

4.6 Análisis de algunos compuestos por UPLC-QToF-MS

Esta técnica se llevó a cabo en los Servicios Generales de la Facultad de Ciencias de la Universidad del País Vasco (UPV). Se analizaron CIH-10 y CIH-13.

Las condiciones experimentales bajo las cuales se desarrolló el análisis se detallan a continuación. Se utilizaron una columna de fase inversa (Acquity UPLC C18 CSH, 100 x 2.1 mm, 1.7 μm) y una precolumna (Acquity UPLC C18 CSH 1.7 μm VanGuardTM) a 65 °C. Las muestras se disolvieron en cloroformo/metanol (1:2 v/v) a una concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$. Las fases móviles fueron acetonitrilo y agua (40:60 v/v) con formato de

amonio 10 mM y ácido fórmico al 0.1% (fase A) y acetonitrilo e isopropanol (10:90 v/v) con formato de amonio 10 mM y ácido fórmico al 0.1% (fase B). El caudal fue de 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ y el volumen de inyección fue de 7.5 μL . El gradiente utilizado se estableció de la siguiente manera: las condiciones iniciales fueron 40% B, aumentadas a 43% B durante 2.0 min y a 50% B durante 0.10 min más. Durante los siguientes 9.90 minutos subió a 54% B y en 0.1 minutos más a 70% B. En 5.90 minutos subió a 100% B y se mantuvo en 100% B hasta 19 minutos, disminuyó a 40% B durante los siguientes 0.1 minutos y se mantuvo a 40% B por 1.90 min para el reequilibrio del sistema antes de la siguiente inyección.

Para la espectrometría de masas el voltaje capilar se ajustó a 1 kV. El nitrógeno se usó como gas de desolvatación y de cono, a caudales de 1000 L/h y 10 L/h, respectivamente. La temperatura de la fuente fue de 120 °C y la temperatura de desolvatación fue de 500 °C. Se usó una solución de leucina-encefalina (2 ng/ μL) para la corrección de la masa de bloqueo. Los iones a relaciones de masa a carga (m/z) 556.2771 y 278.1141, se monitorizaron en el tiempo de exploración 0.3 s y en intervalos de 10 s, tres exploraciones en promedio, utilizando una ventana de masa de ± 0.5 Da. Otras condiciones fueron: capilar de bloqueo 2.0 kV y energía de colisión 21 eV. El estándar interno de referencia se introdujo en el rociador de masa de bloqueo a un caudal constante de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ usando una bomba externa. Todos los espectros obtenidos se corrigieron automáticamente durante la adquisición utilizando la masa de bloqueo. Antes del análisis, el espectrómetro de masas se calibró con una solución de formato de sodio 0.5 mM.

La adquisición de datos tuvo lugar en el rango de masa entre 50–1200 en modo de resolución ($\text{FWHM} \approx 20,000$) con un tiempo de exploración de 0.3 segundos y un retardo entre exploraciones de 0.024 segundos. El voltaje del cono se ajustó a 40 V.

El espectrómetro de masas funcionó en el modo continuo de adquisición MS^E. Durante este método de adquisición, el primer cuadrupolo Q1 se operó solo en un modo rf de banda ancha, lo que permitió que todos los iones ingresaran en la celda de colisión de la onda T. Se crearon automáticamente dos funciones de adquisición intercaladas independientes y discretas: la primera función, normalmente establecida en 6 eV, recolectada de baja energía o datos no fragmentados, mientras que la segunda función recolectaba alta energía o datos fragmentados, típicamente obtenida mediante el uso de una rampa de energía de colisión de 15 a 40 eV. En ambos casos, se utilizó gas Ar para la disociación inducida por colisión.

Por su parte, la base esfingoide acetilada obtenida por la metanólisis de CIH-10, y el compuesto CIH-15 fueron analizados usando la misma técnica, pero en la UAEM. Se utilizó una Columna Zorbax C18, 100 x 2.1 mm, 1.7 µm, sin precolumna, a 25 °C. Las muestras se disolvieron en 0.7 mL de diclorometano/metanol (1:2 v/v), no se determinó la concentración, se tomó la muestra completa. Las fases móviles consistieron en acetonitrilo y agua (40:60 v/v) con formato de amonio 10 mM y ácido fórmico al 0.1% (fase A) y acetonitrilo e isopropanol (10:90 v/v) con formato de amonio 10 mM y ácido fórmico al 0.1% (fase B). Para la detección se utilizaron condiciones lo más cercanas posibles a las utilizadas en la UPV. Se indican las diferencias: temperatura de desolvatación 400 °C, no se utilizaron los compuestos de bloqueo, el modo de detección requerido fue positivo. Se calibró el equipo para cada modo (negativo y positivo) previa inyección de las muestras cada vez que se cambió el modo. La solución calibrante fue una mezcla de compuestos con masas entre 118 y 2121. No se utilizó rampa de energía de colisión, esta fue fija. Todas las muestras se adquirieron en las mismas condiciones, se extrajeron las masas de dos muestras blanco y se excluyeron de las masas de cada una de

las muestras.

4.7 Ensayos biológicos

La actividad antibacteriana y antimicobacteriana se realizaron en el Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario de la UANL. La actividad citotóxica se desarrolló en la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

4.7.1 Actividad antibacteriana

4.7.1.1 Cepas bacterianas y cultivo

Para los ensayos de actividad antibacteriana se utilizaron cepas de aislados clínicos farmacorresistentes de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, cuatro de las cuales están incluidas en la lista de patógenos prioritarios emitidas por la OMS²² (Tabla 8). Estos aislados clínicos proceden del Hospital Universitario “Eleuterio González”, UANL. Las cepas fueron inoculadas en placas preparadas con Agar-sangre 5% y cultivadas por 24 horas a 37 °C.

Tabla 8. Aislados clínicos de bacterias farmacorresistentes utilizados en el proyecto

Gram-negativas	Gram-positivas
<i>Acinetobacter baumannii</i> resistente a carbapenémicos (12-666)	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a Meticilina (14-2095)
<i>Escherichia coli</i> productora de BLEE (14-2081)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> resistente a Linezolid (14-583)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a carbapenémicos (13-1391)	<i>Enterococcus faecium</i> resistente a Vancomicina (10-984)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente a oxacilinas (OXA-48)	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NDM-1+ (14-3335) resistente a carbapenémicos y cefalosporinas de amplio espectro	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> productora de BLEE (14-2081)	

4.7.1.2 Preparación de muestras

Tanto para el ensayo antibacteriano como antimicobacteriano las muestras se prepararon de igual forma: 2 mg de cada compuesto fueron disueltos en 1 mL de DMSO (extractos 4 mg en 2 mL de DMSO), obteniéndose una concentración inicial de 2000 µg/mL. Se tomaron 25 µL de la misma y se le adicionaron 225 µL de caldo Mueller Hinton, obteniéndose las soluciones de trabajo 4X.

4.7.1.3 Preparación del inóculo

Para la preparación del inóculo, se transfirieron de tres a cinco colonias de cada cultivo a tubos con solución salina estéril, y la turbidez fue ajustada a 0.5 del estándar de McFarland (1.5×10^8 UFC/mL). Posteriormente, se depositaron 10 µL en 11 mL de caldo Mueller Hinton, para alcanzar 5×10^5 UFC/mL.⁶⁸

4.7.1.4 Ensayo biológico

La actividad antibacteriana fue determinada por el método de microdilución, utilizando como referencia lo reportado por Zgoda *et al.*⁶⁹ Este método consistió en utilizar microplacas de 96 pocillos estériles de fondo redondo con tapa, a las cuales se les adicionaron 100 µL de caldo Mueller Hinton en cada pocillo.

Posteriormente, en el primer y segundo pocillo de la fila A se adicionaron 100 µL de la solución de trabajo (por duplicado) con la concentración de 4X. Cada compuesto se evaluó a partir de 200 µg/mL y los extractos a 500 µg/mL, cada concentración se ensayó por duplicado. A partir de la fila A se comenzó a realizar la dilución 1:2 empleando una micropipeta multicanal hasta llegar a la fila G, desechando los últimos 100 µL. Después, se tomaron 100 µL de la suspensión bacteriana ajustada al tubo 0.5 de McFarland y se adicionaron a los pozos con muestra, y a los que contenían el control positivo. La microplaca se sometió a incubación a 37 °C durante 24 horas. Al término de la incubación

se evaluó de forma visual el crecimiento o inhibición de la bacteria, tomándose como inhibición los pocillos donde no se observó turbidez ni depósito de bacterias en el fondo. Se utilizó levofloxacin como control positivo de referencia. Se determinó la CMI como la mínima concentración del compuesto que inhibe el crecimiento de la bacteria. Los experimentos se repitieron tres veces.

4.7.2 Actividad antimicobacteriana

4.7.2.1 Cepas y cultivo

Se empleó *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), la cual es sensible a isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida, y un aislado clínico multifarmacorresistente (MFR) con clave G122 (resistente a isoniazida, rifampicina y etambutol). Las cepas se cultivaron en Agar Lowenstein-Jensen durante un mes, posteriormente las cepas se pasaron al medio líquido Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC, se incubaron a 37°C durante 2 semanas, con el fin de alcanzar la fase logarítmica de crecimiento.

4.7.2.2 Preparación del inóculo

El inóculo para el ensayo biológico se preparó diluyendo el cultivo en fase logarítmica hasta ajustar la turbidez al estándar No. 1 de McFarland, luego se diluyó 1:20 con medio Middlebrook 7H9.

4.7.2.3 Ensayo biológico

El ensayo se realizó de acuerdo a lo descrito por FranzBlau *et al.*⁷⁰ y Camacho-Corona *et al.*⁷¹ El método se basa en que los microorganismos en crecimiento liberan deshidrogenasas (NADH) al medio, que reducen la resazurina que es de color azul a resorufina que es de color rosa.

El ensayo se llevó a cabo en microplacas de 96 pocillos, solamente a nivel de extractos, partiendo de una concentración de 500 µg/mL. Cada concentración se ensayó por

duplicado. Se colocaron 200 μ L de agua estéril en todos los pozos de la fila A y en los pozos H1, H2, H3, H10, H11 y H12, dejando los pozos del centro sin agua para evitar la evaporación del medio de cultivo. A los pozos de la fila B hasta la G se les agregaron 100 μ L de medio Middlebrook. Después en la fila B se añadieron 100 μ L de la solución de trabajo 4X (2000 μ g/mL) obteniendo una concentración de DMSO < 1% v/v en los pozos. Se prosiguió con las diluciones 1:2 de la fila B a la G, posteriormente se añadieron 100 μ L del inóculo bacteriano previamente preparado. En los pocillos que quedaron de la fila H (H-4 a H-10) se colocaron tres controles negativos 100:100, 10:100 y 1:100, los cuales representan el 100%, 10% y 1% de la población bacteriana a ensayar.

Las placas se incubaron a 37 °C por 5 días, después de este tiempo se les adicionaron 20 μ L de reactivo Alamar Azul y 12 μ L de Tween 80 al 10% a los controles, se incubaron nuevamente y a las 24 horas se les agregó el reactivo de Alamar Azul y 12 μ L de Tween 80 al 10% a toda la placa, re-incubando a 37 °C por 48 horas. Al término de la incubación se evaluó de forma visual el crecimiento o inhibición de la bacteria, tomándose como inhibición los pocillos donde permaneció el color azul, mientras que en los pocillos donde cambió a color rosa se tomó como no inhibición. Se utilizó isoniazida, rifampicina, etambutol y levofloxacina como controles positivos de referencia. Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) como la mínima concentración del compuesto que inhibe el crecimiento de la bacteria.

4.7.3 Actividad citotóxica

4.7.3.1 Líneas celulares y cultivo

Para los ensayos de citotoxicidad se utilizaron seis líneas de células cancerosas humanas: PC3 (cáncer de próstata), Hep3B y HepG2 (carcinoma hepatocelular), MCF7 (cáncer de mama), A549 (cáncer de pulmón) y HeLa (cáncer cérvico-uterino). Además, fue incluida

una línea celular de hepatocitos humanos inmortalizados (IHH) como control de células no cancerosas.⁷² Las células PC3 se cultivaron en medio RPMI-1640, mientras que Hep3B, HepG2, IHH, MCF7, A549 y HeLa en medio DMEM, suplementado con suero bovino fetal al 10% y con glutamina 2 mM, todos los cultivos se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5% durante 48 h.

4.7.3.2 Ensayo biológico

Para la evaluación citotóxica en placas de 96 pocillos se cultivaron 4000 células por pocillo. Las concentraciones utilizadas para los extractos y los compuestos puros fueron 100, 10, 1, 0.1, 0.01 µg /mL para una curva de dosis/respuesta e incubadas a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5% durante 48 h. La cantidad de células viables sin proliferación se determinó usando el kit de ensayo de proliferación de células de solución acuosa Cell Titer 96®, siguiendo las instrucciones del fabricante. La viabilidad celular se determinó midiendo la absorbancia a 450 nm usando un lector de ELISA automatizado. Los experimentos se realizaron por triplicado en tres experimentos independientes. Se utilizó Paclitaxel como referencia. Los datos se analizaron en el programa estadístico Prism 5.0 y los valores de IC₅₀ se determinaron mediante análisis de regresión.

4.7.3.3 Índice de Selectividad (IS)

El índice de selectividad fue determinado solamente frente a las líneas de carcinomas hepatocelulares, tanto en extractos como en compuestos, lo cual permitió determinar la selectividad de la actividad citotóxica en las mismas. El IS fue calculado usando la ecuación (1):⁷³

$$IS = \frac{IC_{50} \text{ células IHH}}{IC_{50} \text{ células cancerígenas}} \quad (1)$$

4.8 Técnicas para determinar el posible mecanismo de acción del compuesto

antibacteriano más activo

4.8.1 Construcción del modelo computacional predictivo

Procesamiento de datos y fusión de información: el proceso de análisis de datos utilizado implicó tres pasos principales; (1) adquisición y pre-procesamiento de datos, (2) el procedimiento de fusión de la información (IF, *por sus siglas en inglés*) para fusionar los conjuntos de datos de ChEMBL, de las redes de reacción metabólica (MRN, *por sus siglas en inglés*), y de las secuencias de proteínas y (3) obtención del modelo Perturbation-Theory-Machine-Learning and Information Fusion (PTMLIF, *por sus siglas en inglés*).⁷⁴

- 1) La adquisición de datos se realizó desde la base de datos ChEMBL que contiene los resultados de muchos ensayos preclínicos e información de secuencias de proteínas. El valor del parámetro experimental que se usa en ChEMBL para cuantificar la actividad biológica se identificó como v_{ij} . Este parámetro cuantifica la actividad i^{th} de la molécula (m_i) sobre la diana j^{th} . Los valores de ε_{ij} dependen de la estructura del fármaco y de una serie de condiciones de contorno que delimitan las características del ensayo $c_j = (c_0, c_1, c_2 \dots c_n)$. Las condiciones c_j fueron: c_0 = actividad biológica, c_1 = acceso a proteínas, c_2 = microorganismo de ensayo, c_3 = cepa de ensayo c_4 = MRN del microorganismo, c_5 = proteína diana, c_6 = mapeo de diana moleculares, c_7 = puntuación de confianza, c_8 = curación y c_9 = tipo de ensayo.

En el conjunto de datos encontramos muchos parámetros biológicos diferentes v_{ij} ; por ejemplo, Concentración Mínima Inhibitoria (CMI ($\mu\text{g/mL}$)) o Concentración Mínima Bactericida (CMB ($\mu\text{g/mL}$)), *etc.* Además, consideramos que las propiedades pueden tener una desirabilidad positiva o negativa $d(c_1)$. La función

de valor deseado $d(c_1) = 1$ se estableció cuando el parámetro v_{ij} cuantifica una propiedad biológica que queremos maximizar para obtener un fármaco óptimo (este es el caso de la Selectividad). A la inversa, la función de valor deseado es negativa $d(c_1) = -1$ significa que queremos minimizar el valor v_{ij} del parámetro de actividad biológica (por ejemplo, CMI ($\mu\text{g/mL}$)).

La existencia de distintos parámetros biológicos v_{ij} , con distintas unidades, y diferentes valores deseados dificultan el desarrollo del modelo de regresión. Por lo tanto, hemos discretizado valores v_{ij} para buscar un modelo de clasificación.

La discretización fue la siguiente: $f(v_{ij})_{\text{obs}} = 1$ cuando $v_{ij} > \text{cutoff}$ y $d(c_1) = 1$. Igualmente, el valor de $f(v_{ij})_{\text{obs}} = 1$ cuando $v_{ij} < \text{cutoff}$ y $d(c_1) = -1$, $f(v_{ij})_{\text{obs}} = 0$ en cualquier otro caso. El valor $f(v_{ij})_{\text{obs}} = 1$ apunta a un fuerte efecto del compuesto sobre el blanco con respecto al valor de corte fijado.⁷⁴

- 2) Para llevar a cabo el proceso de fusión de la información (IF), se fusionaron los datos provenientes de ChEMBL, MRNs y Protein Data Bank. En este sentido, se optó por transformar toda la información de las bases de datos en la misma escala. En consecuencia, el contenido de los conjuntos de datos se transformó en una escala de entropía de Shannon previamente a la fusión. La información obtenida de ChEMBL (estructura química) se escaló utilizando la fórmula (2) para calcular el valor de entropía de Shannon⁷⁵:

$$Sh_k(Drug_i) = -p(D_{ki}) \cdot \log(p(D_{ki})) = -\frac{(D_{ki} - D_{kmin} + 0.001)}{(D_{kmax} - D_{kmin} + 0.001)} \cdot \log \left[\frac{(D_{ki} - D_{kmin} + 0.001)}{(D_{kmax} - D_{kmin} + 0.001)} \right] \quad (2)$$

En esta fórmula, D_{ki} es el valor del descriptor molecular del fármaco (LogP o PSA).

El valor $p(D_{ki})$ es el resultado de escalar los descriptores moleculares a una escala de probabilidad que va de 0 a 1. Los valores $D_{k\min}$ y $D_{k\max}$ son el valor mínimo y máximo del descriptor molecular D_{ki} en todo el conjunto de datos. El valor 0.001 se agregó como un valor de escala para evitar $p(D_{ki}) = 0$; lo cual está prohibido para la función de entropía logarítmica.⁷⁵

Los valores anteriores obtenidos de $Sh_k(\text{Drug}_i)$ se utilizaron para cuantificar la estructura de los compuestos químicos. Sin embargo, en este procedimiento se tuvo que cuantificar también la información estructural de las MRN_s y de las secuencias de proteínas. La información estructural de las MRN_s para las diferentes especies proviene del grupo de investigación de León-Barabási.⁷⁶ Los registros están en archivos comprimidos ASCII, donde cada número representa un sustrato en la red metabólica. También se cuantificó la información estructural de las MRN_s utilizando la escala de entropía de Shannon. Al hacerlo, calculamos los valores de entropía $Sh_k(\text{MRN}_s)$ de orden k^{th} para la especie s^{th} . Los valores de $Sh_k(\text{MRN}_s)$ miden la información de conectividad en la MRN de las especies de todos los metabolitos y sus vecinos (sustratos o productos) colocados a una distancia (número de reacciones) $\leq k$. Para calcular estos índices se utilizó un enfoque de matriz de Markov (${}^1\Pi$). Esta matriz se usó para calcular las probabilidades absolutas $p_k(m_q)$ con las cuales el metabolito m_q se transforma (q^{th}) y es el producto de las diferentes reacciones. Finalmente, los valores de $Sh_k(\text{MRN}_s)$ se calculan como la suma de la entropía para cada nodo (metabolito m_q) en las MRN_s. En la Tabla 9, se muestran algunos organismos, los códigos de dos letras y los valores de $Sh_k(\text{MRN}_s)$ para las redes de reacción metabólica estudiadas. La fórmula utilizada para calcular estos valores fue la siguiente (3).⁷⁵

$$Sh_k(MRN_s) = - \sum_{q=1}^{q=qmax} p(m_q) \cdot \log p(m_q) \quad (3)$$

Tabla 9. MRN_s incluidas en este trabajo, ejemplos seleccionados

Microorganismos	Códigos	Sh ₂ (MRN)
<i>Bacillus subtilis</i>	BS	0.014
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	CA	0.009
<i>Campylobacter jejuni</i>	CJ	0.012
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	CQ	0.038
<i>Chlamydia trachomatis</i>	CT	0.018
<i>Escherichia coli</i>	EC	0.008
<i>Enterococcus faecalis</i>	EF	0.011
<i>Haemophilus influenzae</i>	HI	0.013
<i>Helicobacter pylori</i>	HP	0.017
<i>Mycobacterium bovis</i>	MB	0.009
<i>Mycoplasma genitalium</i>	MG	0.017
<i>Mycobacterium leprae</i>	ML	0.009
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	MP	0.020
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	MT	0.014
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	NG	0.011
<i>Neisseria meningitidis</i>	NM	0.012
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA	0.016
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	PG	0.011
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	PN	0.011
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	RC	0.015
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SC	0.011
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ST	0.011
<i>Salmonella typhi</i>	TY	0.007
<i>Yersinia pestis</i>	YP	0.013

3) Modelo lineal PTMLIF. Recientemente se ha introducido una técnica de modelado PTMLIF de propósito general, útil para cuantificar el efecto de las perturbaciones en sistemas biomoleculares complejos. Usando un modelo PTMLIF, es posible predecir los

valores de la función $f(v_{ij})$ para el compuesto i^{th} probado en el ensayo preclínico j^{th} con condiciones $c_j = (c_0, c_1, \dots)$ contra la especie bacteriana s^{th} con determinadas secuencias de proteínas y MRNs. Los modelos lineales PTMLIF siguen la ecuación general (4).

$$\begin{aligned}
 f(v_{ijs})_{calc} = & a_0 + a_1 \cdot f(v_{ij})_{expt} + \sum_{k=1}^{k=2} a_k \cdot Sh_k(Drug_i) \\
 & + \sum_{k=1, j=1}^{k=2, j=2} a_{k,j} \cdot \Delta Sh_k(Assay_j)_{c_j} \\
 & + \sum_{k=1, j=1}^{k=2, j=2} a_{k,j} \cdot \Delta Sh_k(MRN_s)_{c_j}
 \end{aligned} \quad (4)$$

El modelo PTMLIF parte del valor esperado de la actividad biológica $f(v_{ij})_{expt}$ y suma el efecto de la información química relacionada con la estructura del fármaco y los efectos acumulados debido a cambios o perturbaciones (operadores PT) en las condiciones de ensayo, cepas de bacterias utilizadas y secuencias de proteínas. Los operadores PT utilizados son similares a los operadores de Promedio Móvil (MA, *por sus siglas en inglés*) de Box-Jenkins utilizados en trabajos anteriores.⁷⁷ Los otros operadores PT incluidos en este modelo son Promedios Móviles (MA) calculados para una condición a la vez. En el modelo PTMLIF tenemos tres tipos de operadores PT debido al proceso IF. Calculamos estas variables como:

$$\Delta Sh_k(Assay_j)_{c_j} = Sh_k(Drug_i) - \langle Sh_k(Assay_j)_{c_j} \rangle$$

$$\Delta Sh_k(MRN_s) = Sh_k(MRN_s) - \langle Sh_k(MRN_s)_{c_j} \rangle$$

$$\Delta Sh_k(Prot_s) = Sh_k(Prot_s) - \langle Sh_k(Prot_s)_{c_j} \rangle, \text{ respectivamente.}$$

En consecuencia, los términos de $\Delta Sh_k(Assay_j)_{c_j}$ explican la desviación de la información

química del compuesto Sh_k ($Drug_i$) del valor esperado de $\langle Sh_k(c_j) \rangle$ (valor promedio) para todos los compuestos analizados en las mismas condiciones C_j en el conjunto de datos ChemBL. Por analogía, los términos $\Delta Sh_k (MRN_s)c_j$ y $\Delta Sh_k(Prot_s)c_j$ cuantifican la desviación de la información de la red metabólica de las bacterias $Sh_k (MRN_s)$ y de las secuencias de proteínas, de los valores esperados de $\langle Sh_k(MRN_s)c_j \rangle$ y $\langle Sh_k(Prot_s)c_j \rangle$, respectivamente, para las mismas condiciones.

4.8.2 Docking molecular

Todo el procesamiento se realizó en el clúster BioCAI de la Universidad de Coruña, España. La fuerza de las interacciones se cuantificó por la energía de afinidad (EA) del ligando para dianas de proteínas utilizando el software abierto AutoDockVina.⁷⁸

El flujo de acoplamiento tiene varios pasos que incluyen el procesamiento del ligando y proteínas, la conversión y la optimización de la geometría antes de los cálculos de acoplamiento. Por lo tanto, el ligando se presenta como una lista de fórmulas de SMILES y se convierten en PDB con una estructura 3D optimizada utilizando el software Babel.⁷⁹

Los blancos de proteínas se filtran sólo para el primer modelo de PDB, se elimina la parte no proteica (moléculas de agua, otros ligandos, *etc.*). El PDB de ligando y proteínas se convierte en formato PDBQT utilizando “AutoDock Tools scripts” (`prepare_ligand4.py` y `prepare_receptor4.py`).⁸⁰ El sitio de acción de la proteína se considera rígido en todos los cálculos de acoplamiento y la búsqueda de interacción está considerando toda la superficie de los targets. El flujo de acoplamiento se basa en los scripts de Python y Bash, incluida la lectura de los resultados finales. El límite para las interacciones estables se considera $EA < -7.0 \text{ kcal / mol}$.⁸¹ Los resultados se basan en el primer conformero de acoplamiento de los ligandos con una desviación de la media cuadrada de la raíz de las posiciones atómicas (RMSD, *por sus siglas en inglés*) de 0.⁸²

4.8.3 Ensayo de liberación de contenidos vesiculares

El ensayo se realizó en el Instituto de Biofísica de la Universidad del País Vasco.

4.8.3.1 Preparación de LUV con solutos encapsulados

Se prepararon liposomas de 1,2-di-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DOPC), para ello, en primer lugar, se evapora en nitrógeno el cloroformo/metanol (2:1) en el que está disuelto el lípido obteniéndose así una película de lípido seca. Esta, se mantiene durante 2 horas en un desecador a vacío eliminando así las trazas de los disolventes orgánicos. A continuación, y en el proceso de formación de liposomas MLV, se co-encapsularon la sonda fluorescente ANTS junto con un atenuador DPX, a una relación DPX: ANTS ~4:1. Para ello, el lípido se hidrató en el buffer ANTS 12,5 mM, DPX 45mM, NaCl 70 mM, Tris 20 mM (pH 8.0) obteniéndose una suspensión de MLV. Los liposomas se mantuvieron durante todo el proceso a una temperatura por encima de la temperatura de transición (T_m) de los lípidos que componen la muestra, es decir, entre la fase gel y la fase fluida. Para disminuir el número de lamelas de los MLV, estos se sometieron a ciclos de congelación-descongelación, pasando la muestra de una temperatura de -180°C , en nitrógeno líquido, a un baño termostatzado. Al finalizar los ciclos se obtuvo una suspensión de FTMLV (del inglés *Freeze and Thaw Multilamellar Vesicles*). Este proceso aumenta la eficacia en la encapsulación de solutos.

La muestra de FTMLV se sometió a extrusión con objeto de obtener liposomas LUV del tamaño deseado. Para ello, la suspensión de liposomas se pasó 10 veces a través de dos filtros de polycarbonato Nuclepore con un diámetro de poro de 100 nm, para obtener poblaciones de liposomas más homogéneas.⁸³ La extrusión se realizó en un extrusor suministrado por Northern Lipids.

La sonda no encapsulada se separó de los LUV mediante cromatografía de tamizado molecular en una columna PD-10 equilibrada con un tampón isosmótico NaCl 150 mM, Tris 20 mM (pH 8.0). La osmolaridad de los tampones se igualó en un osmómetro. Finalmente, se calculó la concentración de LUV por determinación de fósforo hidrosoluble.

4.8.3.2 Determinación de la concentración de fosfolípidos

La determinación de la concentración de fosfolípidos en las preparaciones de LUV se realizó mediante el método colorimétrico que permite cuantificar la concentración de fósforo inorgánico en la muestra. Este método es una modificación del método descrito por Fiske y Subbarow.⁸⁴ Para ello, se preparó una recta patrón con NaH_2PO_4 entre 0 y 100 nmoles de fósforo. Las muestras problema y la recta patrón se digieren con 0.5 mL de ácido perclórico 70% durante 45 minutos a 200 °C. A continuación, se añadieron a cada tubo 4 mL de una solución de heptamolibdato (2.2 g heptamolibdato amónico, 14.3 mL ácido sulfúrico 95-98%, volumen final 1 L) e inmediatamente después, se añadieron 0.5 mL de una disolución de ácido ascórbico 10% (p/v) en agitación. Las muestras se calentaron a 100°C durante 10 minutos para que el fosfato reaccionara con el molibdato y, de esta manera, transformarse en ácido fosfomolibdico, que posteriormente se redujo y produjo un compuesto coloreado. Finalmente, se midió la absorbancia de las muestras a 812 nm en un espectrofotómetro UV-Vis y se determinó la concentración de fosfato en las muestras a partir de la recta patrón.

4.8.3.3 Liberación de contenidos encapsulados en LUV

El ensayo de liberación de contenidos se utilizó para estudiar el efecto de la interacción del compuesto seleccionado con un sistema modelo membranas (LUV). A través de la liberación de contenidos encapsulados dentro de los liposomas, se puede estudiar de forma

indirecta la perturbación de la permeabilidad de la membrana provocada por la acción del compuesto en estudio. El método utilizado para realizar este ensayo es el descrito por Ellens *et al.*⁸⁵, basado en la atenuación de la fluorescencia del ANTS por el DPX. Ambas moléculas se encapsularon en el interior de los liposomas, de forma que el DPX atenúa la fluorescencia del ANTS casi por completo debido a la corta distancia existente entre ambas. La ruptura de la barrera de permeabilidad de la bicapa conduce a una liberación de los contenidos de los LUV al medio exterior. De esta manera, ambas moléculas se separan al diluirse en el medio y, por tanto, aumenta la fluorescencia del ANTS, ya que a esas distancias intermoleculares no es posible la atenuación por transferencia de energía.⁸⁵ Los ensayos de la liberación de los contenidos vesiculares se realizaron en un fluorímetro Fluoromax-3 tomando medidas a longitudes de ondas fijas, en el máximo de excitación a 355 nm y de emisión a 520 nm del ANTS. La apertura de rejilla para ambos monocromadores, se fijó en 5 nm y se utilizó un filtro de 475 nm en el monocromador de emisión para reducir la señal debida a la dispersión de la luz de excitación. En las cinéticas se siguió el cambio de la señal inicial de los liposomas tras la adición del compuesto, durante aproximadamente 312 min. Para finalizar la reacción y obtener el máximo de fluorescencia del ANTS se añadió el detergente Triton X-100, a una concentración que solubilizó por completo las vesículas. De esta forma se obtuvo el valor de fluorescencia correspondiente al 100% de liberación de la sonda al medio. El porcentaje de liberación causado por el compuesto se cuantificó utilizando la ecuación (5):

$$\% \text{ Liberación} = \frac{F_f - F_0}{F_{100} - F_0} \times 100 \quad (5)$$

Donde F_f es la fluorescencia tras la adición del agente permeabilizante, F_0 el valor de fluorescencia de los liposomas al inicio de la cinética y F_{100} la fluorescencia tras la solubilización de los liposomas con el Triton X-100.

4.9 Disposición de Residuos

La disposición de residuos se realizó en base a las normas establecidas por los departamentos de manejo y control de residuos de la Facultad de Ciencias Químicas, Servicio de Gastroenterología de la Facultad de Medicina, ambos de la UANL, Facultad de Farmacia y Centro de Investigaciones Químicas de la UAEM, así como del Instituto de Biofísica y la Facultad de Ciencias, ambos de la UPV/EHU.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Estudio fitoquímico de las hojas de *C. incisa*

5.1.1 Resultados del análisis del extracto hexánico por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM)

Del análisis por CG-EM del extracto hexánico de las hojas de *C. incisa*, se obtuvo el cromatograma que se muestra en la Figura 6. Los compuestos identificados de acuerdo a la base de datos NIST versión 1.7^a se indican en la Tabla 10.

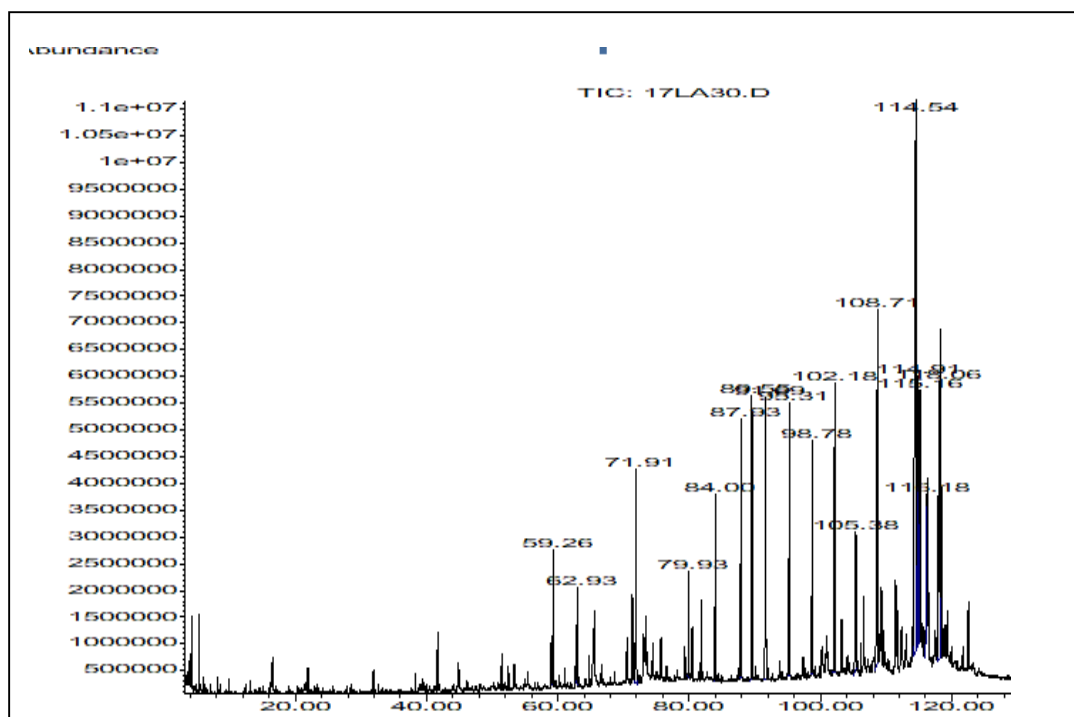


Figura 6. Cromatograma de Gases del extracto hexánico

Tabla 10. Compuestos identificados en el extracto hexánico

tr (min)	% de Abundancia	Nombre del compuesto	Fórmula molecular
59.260	1.91	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	C ₁₈ H ₃₆ O
62.925	1.29	<i>cis</i> -fitol	C ₂₀ H ₄₀ O
71.905	4.09	<i>trans</i> -fitol	C ₂₀ H ₄₀ O
79.925	1.48	heneicosano	C ₂₁ H ₄₄
83.998	3.12	tetracosano	C ₂₄ H ₅₀
87.926	4.86	pentacosano	C ₂₅ H ₅₂
91.690	5.57	hexacosano	C ₂₆ H ₅₄
95.309	5.76	heptacosano	C ₂₇ H ₅₆
98.777	4.49	octacosano	C ₂₈ H ₅₈
102.186	6.08	nonacosano	C ₂₉ H ₆₀
105.379	2.47	triacontano	C ₃₀ H ₆₂
108.709	9.50	hentriacontano	C ₃₁ H ₆₄
114.535	19.44	sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O
114.910	8.43	β-amirina	C ₃₀ H ₅₀ O
115.159	4.91	cicloursanol	C ₃₀ H ₅₀ O
116.177	3.18	α-amirina	C ₃₀ H ₅₀ O
118.056	8.49	β-amirona	C ₃₀ H ₄₈ O

tr: tiempo de retención

Como se puede observar en la Tabla 10 se lograron identificar 17 compuestos mayoritarios volátiles del extracto hexánico de las hojas de *C. incisa*. Estos incluyen nueve hidrocarburos saturados (heneicosano, tetracosano, pentacosano, hexacosano, heptacosano, octacosano, nonacosano, triacontano, hentriacontano), seis terpenos (*cis* y *trans* fitol, β-amirina, α-amirina, β-amirona, cicloursanol), un esteroide (β-sitosterol), y una cetona (6,10,14-trimetil-2-pentadecanona), siendo el mayoritario el β-sitosterol (19.44%). Los porcentajes de los diferentes compuestos que conforman el extracto hexánico incluyen en su mayoría hidrocarburos saturados (56.25%), seguido de los terpenos (31.25%), un esteroide (6.25 %) y una cetona (6.25%) (Figura 7). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Pathomwichaiwat *et al.*⁸⁶, quienes identificaron triterpenos, fitoles, esteroides y sus derivados en un extracto hexánico de *C. quadrangularis*.

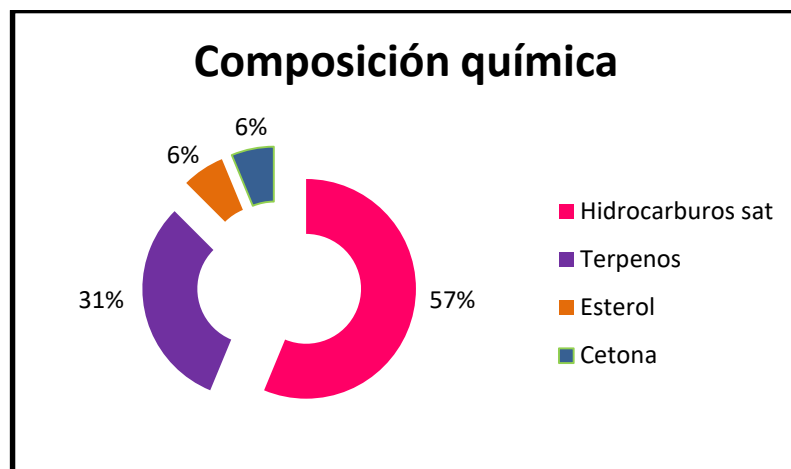


Figura 7. Composición química del extracto hexánico

Del total de los fitocompuestos anteriormente mencionados, sólo seis de ellos han sido identificados previamente dentro del género *Cissus* utilizando CG/EM: fitol, pentacosano, triacontano, heptacosano, α -amirina y β -sitosterol en las especies *C.vitiginea*,^{87,88} *C.quadrangularis*.^{89,90,91} De esta forma es la primera vez que se identifica a cicloursanol dentro del género *Cissus*.

5.1.2 Elucidación estructural de compuestos del extracto $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$

El extracto $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ fue fraccionado por CC, las fracciones resultantes fueron sometidas a sucesivas CC_s sobre gel de sílice y diferentes gradientes de solventes orgánicos, lográndose aislar y caracterizar un monoglicerol, un esterol, dos glucósidos (de esterol y triterpeno, respectivamente), y una ceramida. Adicionalmente se obtuvieron varios sólidos que tras ser analizados utilizando CG-EM y HRMS-ESI resultaron mezclas de hidrocarburos alifáticos (**CIH-1**), alcohol y epóxido (**CIH-3**), triterpenoides (**CIH-5**), ceramidas (**CIH-13**) y cerebrósidos (**CIH-10**).

5.1.2.1 Propiedades físicas y espectroscópicas de CIH-1

Sólido blanco, soluble en cloroformo, punto de fusión (pf) 54-57 °C, IR: 2955.54 cm^{-1} , 2848.3 cm^{-1} , 1472.60 cm^{-1} . RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.89 (t, $J = 8$ Hz, 6H, - CH_3), 1.26 (sa, 50H, - CH_2). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 14.13 (CH_3), 22.71 (CH_2), 29.38 (CH_2), 29.68 (CH_2), 29.72 (CH_2), 31.95 (CH_2).

5.1.2.1.1 Identificación de los constituyentes de CIH-1

En el espectro IR (Figura 8) se observaron las bandas en 2955.54 cm^{-1} y 2848.3 cm^{-1} de C-H de estiramiento (CH_3 y CH_2); en 1472.60 cm^{-1} de flexión (CH_3 y CH_2) y en 720 cm^{-1} de CH_2 (flexión). En los espectros de ^1H y ^{13}C (Figura 9 y 10) se observaron en δ_{H} 0.89 un triplete ($J = 6.82$ Hz) correspondiente a los metilos terminales de las cadenas alifáticas (δ_{C} 14.13). En δ_{H} 1.26 ppm resuena un singulete ancho correspondientes a varios metilenos (δ_{C} 22.71-31.95 ppm). Además, se observaron señales adicionales en δ_{H} 4.2 y 5.2 ppm, los carbonos correspondientes a estas dos señales de hidrógeno no se observan en el espectro de RMN ^{13}C (Figura 10) porque esta técnica es menos sensible que RMN ^1H . Por lo que el compuesto se analizó por CG-EM.

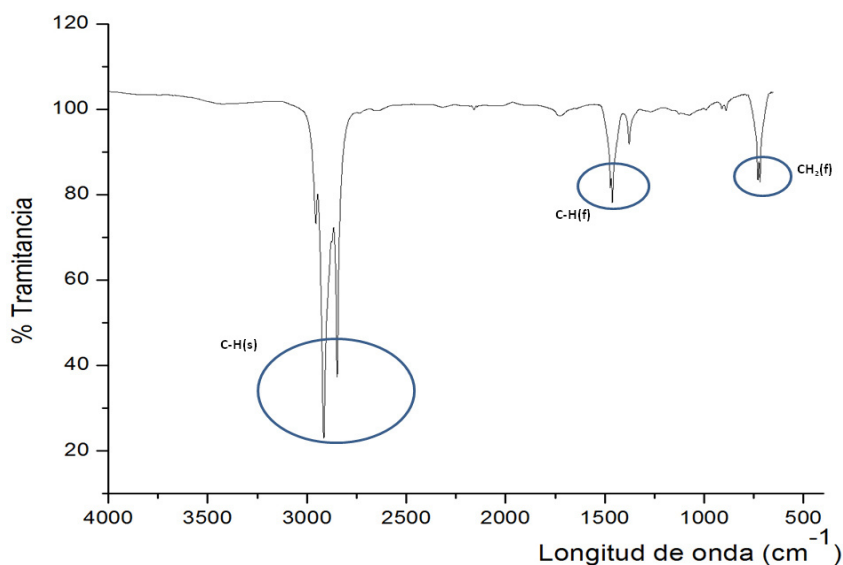


Figura 8. Espectro IR de CIH-1

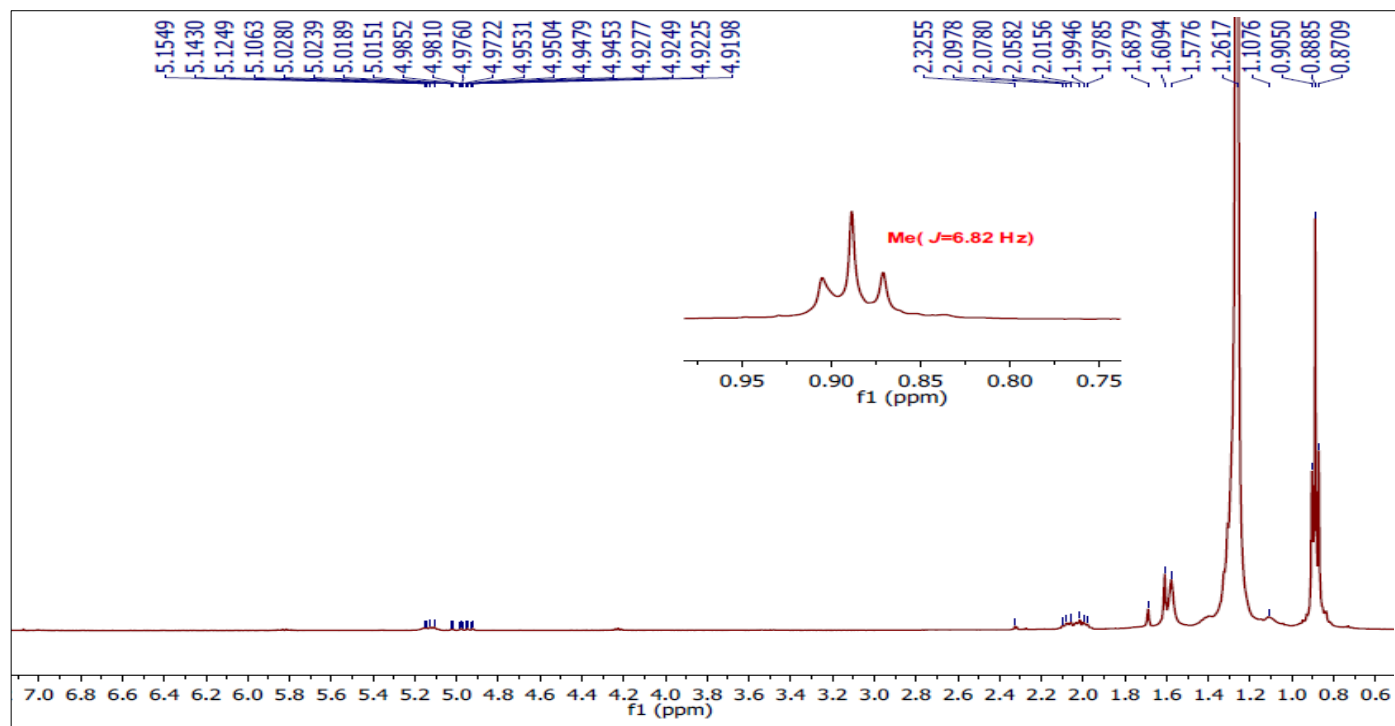


Figura 9. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **CIH-1**

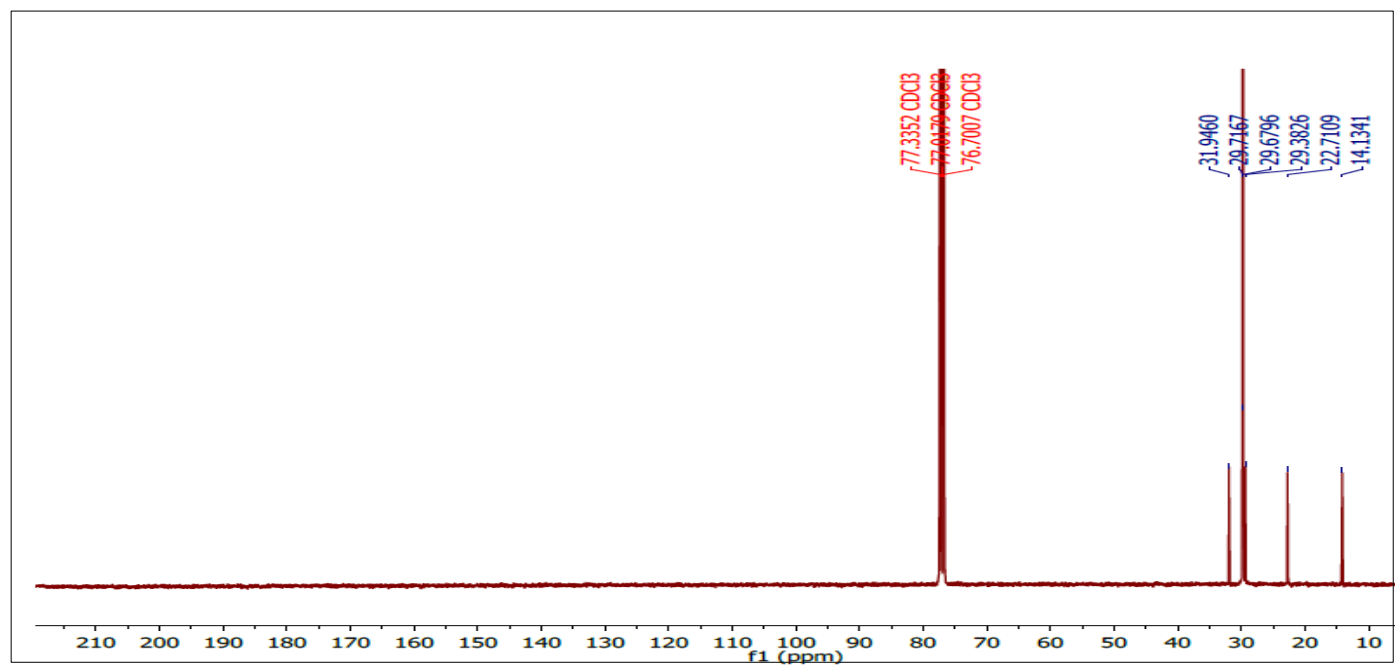


Figura 10. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de **CIH-1**

5.1.2.1.1.1 Análisis de CIH-1 por CG-EM

En el cromatograma se observan 14 picos con diferentes tiempos de retención y área (Figura 11), los cuales se identificaron como 14 alcanos y el escualeno, siendo el más abundante el hentriacontano con un 47% de abundancia (Tabla 11).

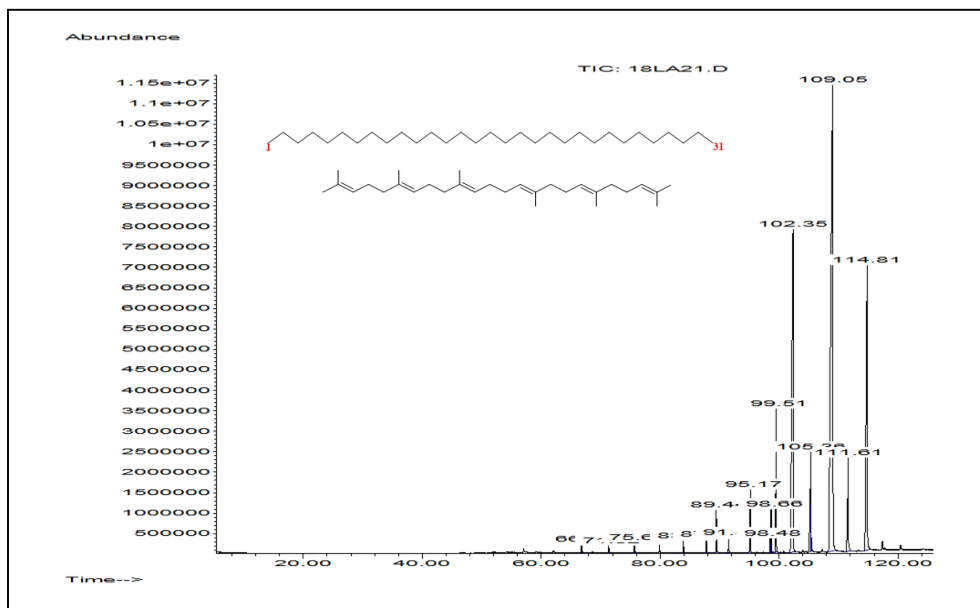


Figura 11. Cromatograma de la muestra **CIH-1**

Tabla 11. Compuestos identificados por CG-EM en **CIH-1**

tr (min)	% de Abundancia	Nombre del compuesto	Peso molecular (g/mol)	Fórmula molecular
66.762	0.279	eicosano	282	C ₂₀ H ₄₂
71.327	0.188	heneicosano	296	C ₂₁ H ₄₄
75.675	0.293	docosano	310	C ₂₂ H ₄₆
83.899	0.322	tetracosano	338	C ₂₄ H ₅₀
87.781	0.346	pentacosano	352	C ₂₅ H ₅₂
91.525	0.385	hexacosano	366	C ₂₆ H ₅₄
95.164	1.587	heptacosano	380	C ₂₇ H ₅₆
98.482	0.357	ciclooctacosano	392	C ₂₈ H ₅₆
98.659	1.106	octacosano	394	C ₂₈ H ₅₈
99.506	3.975	escualeno	410	C ₃₀ H ₅₀
102.351	19.99	nonacosano	408	C ₂₉ H ₆₀
105.359	2.544	triacontano	422	C ₃₀ H ₆₂
109.044	47.560	hentriacontano	436	C ₃₁ H ₆₄
111.612	3.771	dotriacontano	450	C ₃₂ H ₆₆
114.811	16.134	tritriacontano	464	C ₃₃ H ₆₈

5.1.2.2 Propiedades físicas y espectroscópicas de CIH-3

Sólido blanco, soluble en CHCl_3 , pf 79-81°C. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.88 (t, $J=6.8$ Hz, CH_3), 1.25 (sa, CH_2), 1.50-1.53 (m, CH_2), 2.02 (m, CH_2), 3.64 (t, $J=6.4$ Hz, CH_2O), 4.85 (m, OH). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 14.51(CH_3), 23.08 (CH_2), 25.72 (CH_2), 26.13 (CH_2), 29.75 (CH_2), 29.82 (CH_2), 29.97 (CH_2), 29.99 (CH_2), 30.00 (CH_2), 30.05 (CH_2), 30.09 (CH_2), 32.32 (CH_2), 33.21 (CH_2), 63.51 ($\text{CH}_2\text{-OH}$).

5.1.2.2.1 Identificación de los constituyentes de CIH-3

En los espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C (Figura 12 y 13) se observaron a campo alto un metilo terminal (δ 0.88), y en 1.25 ppm un singlete ancho muy propio de cadenas alifáticas largas. Además se encontraron señales a δ (ppm) 3.64 y 4.85 que sugieren la existencia de hidroximetileno (δ_{C} 63.52) y un grupo hidroxilo acoplado a hidroximetileno, por consiguiente se analizó el sólido por CG-EM.

5.1.2.2.1.1 Análisis de CIH-3 por CG-EM

El cromatograma obtenido para el análisis de CIH-3 por CG-EM (Figura 14) mostró dos compuestos, los cuales están prácticamente en proporción 1:1 según lo reflejan sus porcentajes de abundancia (Tabla 12). Se identificó al hexatriacontanol el cual está respaldado por las señales en ^{13}C (δ 63.52) y en ^1H (3.64 y 4.85). Las señales entre 2.30 y 2.44 ppm pueden atribuirse al epóxido, pues usualmente aparecen alrededor de 2.54 ppm. Sin embargo, en el espectro de RMN ^{13}C no se apreciaron las señales para los carbonos del epóxido, lo que pudiera deberse a la menor sensibilidad de esta técnica con relación a la de RMN ^1H .

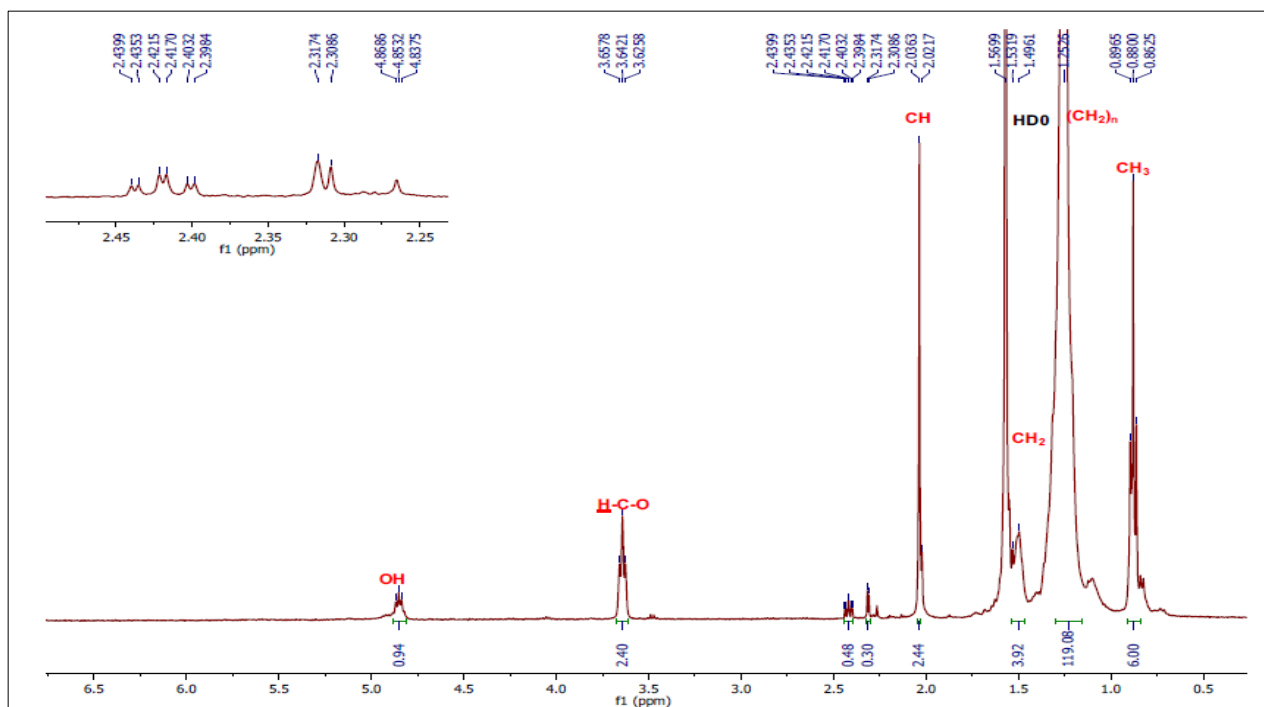


Figura 12. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **CIH-3**

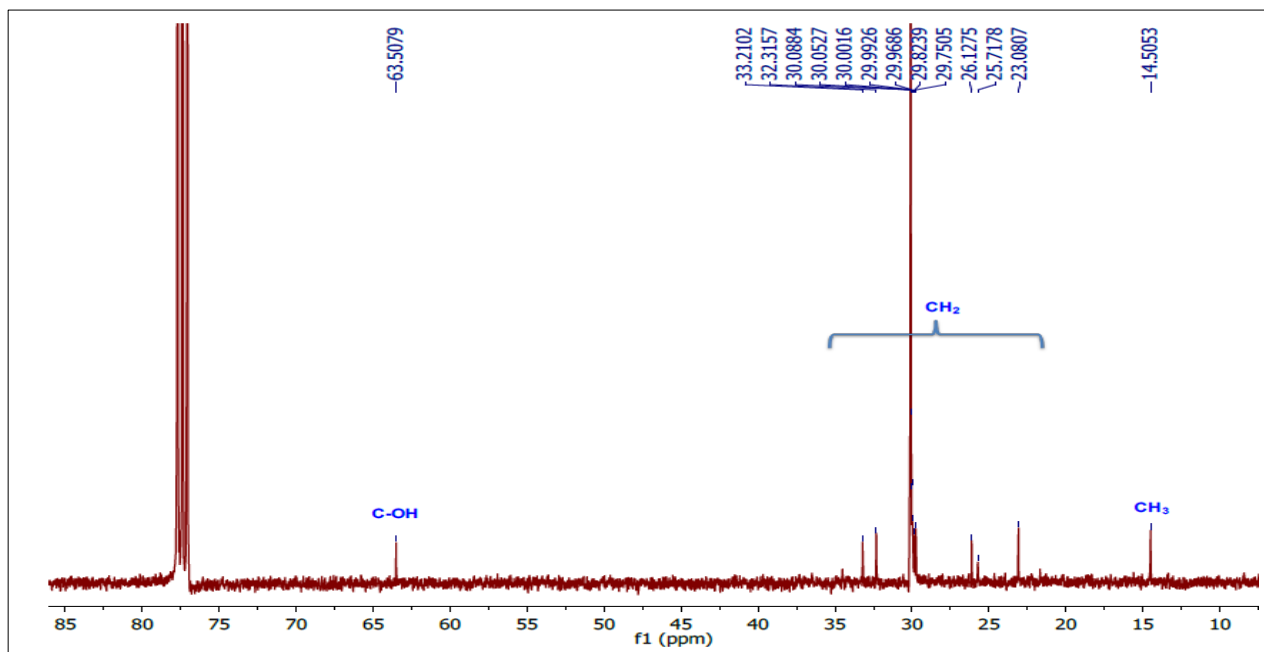


Figura 13. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de **CIH-3**

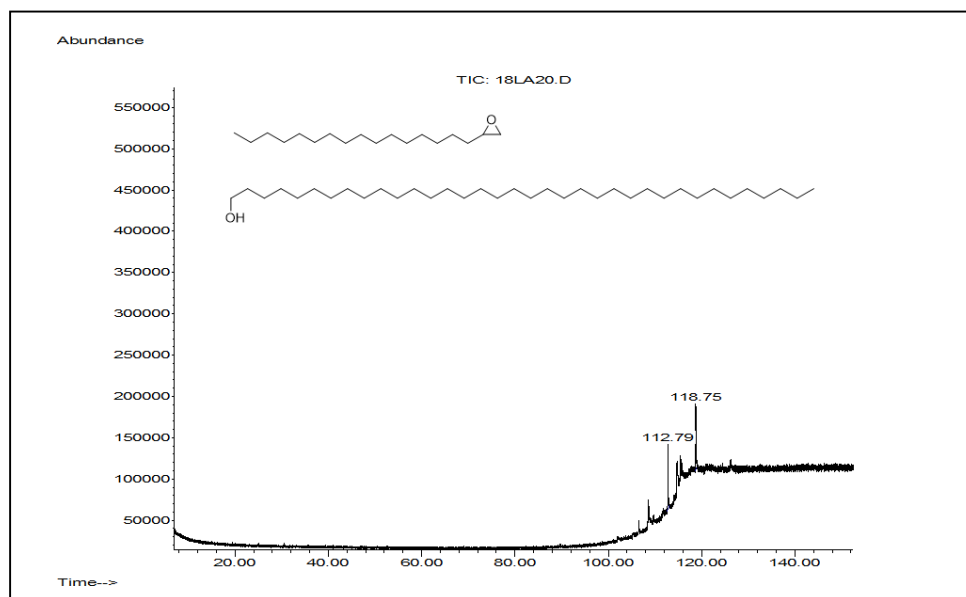


Figura 14. Cromatograma de gases de **CIH-3**

Tabla 12. Compuestos identificados por CG-EM de **CIH-3**

t_R (min)	% de Abundancia	Nombre del compuesto	Peso molecular (g/mol)	Fórmula molecular
112.795	45.125	2-hexadeciloxirano	268	C ₁₈ H ₃₆ O
118.752	54.875	hexatriacontanol	522	C ₃₆ H ₇₄ O

5.1.2.3 Propiedades físicas y espectroscópicas de tetracosanoato de 2,3-dihidroxi-propilo (**CIH-7**)

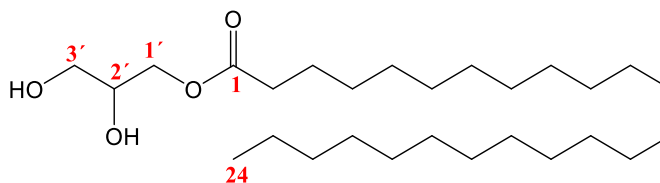


Figura 15. Estructura de tetracosanoato de 2,3-dihidroxi-propilo (**CIH-7**)

Tetracosanoato de 2,3-dihidroxiopropilo (estructura mostrada en la Figura 15): sólido blanco, soluble en cloroformo, pf 81-82°C. $C_{27}H_{54}O_4$, PM_{calc} . 442.4022 g/mol. EM-IE m/z : 442 $[M]^+$. RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 0.88 (t, $J=6.84$ Hz, 3H, Me), 1.25 (sa, CH_2), 1.63 (m, 2H, H-3), 2.05 (t, $J=6.08$ Hz, 1H, OH-3'), 2.35 (t, $J=7.48$ Hz, 2H, H-2), 2.49 (d, $J=5.12$ Hz, 1H, OH-2'), 3.61 (dd, $J=11.4, 5.6$ Hz, 1H, H-3' β), 3.69 (dd, $J=11.34, 4.14$ Hz, 1H, H-3' α), 3.93 (m, 1H, H-2'), 4.14 (dd, $J=1.64, 6.08$ Hz, 1H, H-1' β), 4.21 (dd, $J=11.64, 4.6$ Hz, 1H, H-1' α). RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 14.13 (Me), 22.70 (CH_2), 24.93 (CH_2), 29.14 (CH_2), 29.26 (CH_2), 29.37 (CH_2), 29.46 (CH_2), 29.61 (CH_2), 29.67 (CH_2), 29.71 (CH_2), 31.94 (CH_2), 34.17 (CH_2), 63.34 ($C3'$), 65.19 ($C1'$), 70.29 ($C2'$), 174.46 (C1).

5.1.2.3.1 Elucidación estructural de tetracosanoato de 2,3-dihidroxiopropilo

(CIH-7)

En el espectro RMN 1H (Figura 16) se observó a campos altos, señales comunes a las de ácidos grasos saturados: un triplete en 0.88 ppm ($J=6.64$ Hz) que corresponde al metilo terminal, en 1.25 ppm un singulete ancho característico de una cadena alifática larga. En 1.63 ppm y 2.35 ppm, las señales de las posiciones 2 y 3 de la cadena lateral saturada: un multiplete (H-3), y un triplete (t, $J=7.48$ Hz, H-2) que corresponde al metileno alfa al carbonilo. A continuación, observamos señales que revelaron la presencia de hidroxilos, sugiriendo la presencia de un derivado de glicerol. En 2.05 ppm se observa un triplete ($J=6.08$ Hz) que integra para el hidrógeno del hidroxilo de la posición 3' del glicerol que se acopla con dos hidrógenos del carbono C-3'. La constante de acoplamiento ($J=6.08$ Hz) indica que hay un acoplamiento vecinal. Lo mismo ocurre con el hidroxilo de la posición 2', donde su señal aparece en δ 2.49 como un doblete ($J=5.12$ Hz) debido a que el acoplamiento en este caso es con un hidrógeno (H-2'). En δ 3.61 (dd, $J=11.4, 5.6$ Hz) y δ

3.69 (dd, $J=11.34, 4.14$ Hz) se observan dos dobletes de dobletes, cada uno correspondientes a H-3' β y H-3' α , respectivamente. En 3.93 ppm se encuentra un multiplete que corresponde a H-2'. Los hidrógenos H-1' β y H-1' α aparecen como dos dobletes de dobletes en δ 4.14 (dd, $J=11.64, 6.08$ Hz) y δ 4.21 (dd, $J=11.64, 4.6$ Hz), las constantes de acoplamiento indican que hay un acoplamiento geminal entre ellos y otro vecinal con H-2', de igual manera ocurre con los hidrógenos de la posición 3'. En el espectro de ^{13}C (Figura 17) se pudieron apreciar señales entre 63-70 ppm que respaldaron al derivado de glicerol, siendo las señales en δ 63.34, δ 65.19 y δ 70.29 las correspondientes a los carbonos del glicérido. En este espectro igualmente se observó en δ 14.13 una señal de metilo terminal, de 22.7-34.17 ppm los carbonos metilénicos y, por último, en δ 174.46 la señal que corresponde al carbonilo del éster. CIH-7 fue analizado por EM-IE. Como resultado se identificó al tetracosanoato de 2,3-dihidroxiopropilo por m/z 442 $[M]^+$, 130 $[\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_4]$ (pico base) (Figura 18). El pico base detectado en EM-IE corresponde al fragmento que contiene al glicerol unido al carbonilo, corroborando la presencia de un monoglicerol (Figura 19). Adicionalmente, el m/z 309 obtenido confirma al ácido graso correspondiente. Los datos espectroscópicos obtenidos están acordes con los previamente reportados para un monoglicerol similar aislado de las raíces de *Ibervillea sonora*⁹² (Tabla 13). Es la primera vez que se caracteriza al tetracosanoato de 2,3-dihidroxiopropilo dentro del género *Cissus*.

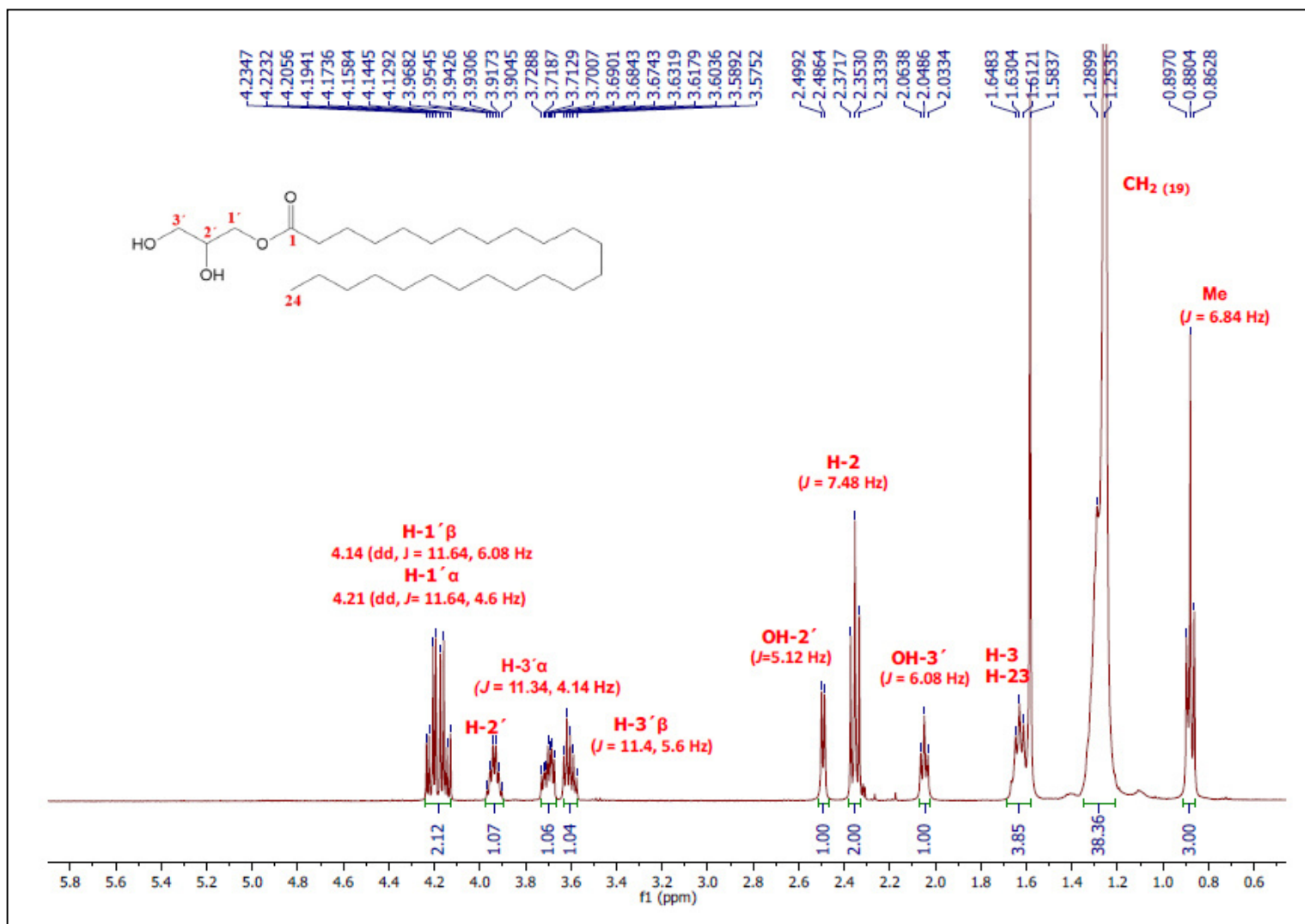


Figura 16. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) de tetracosanoato de 2,3-dihidroxipropilo (**CIH-7**)

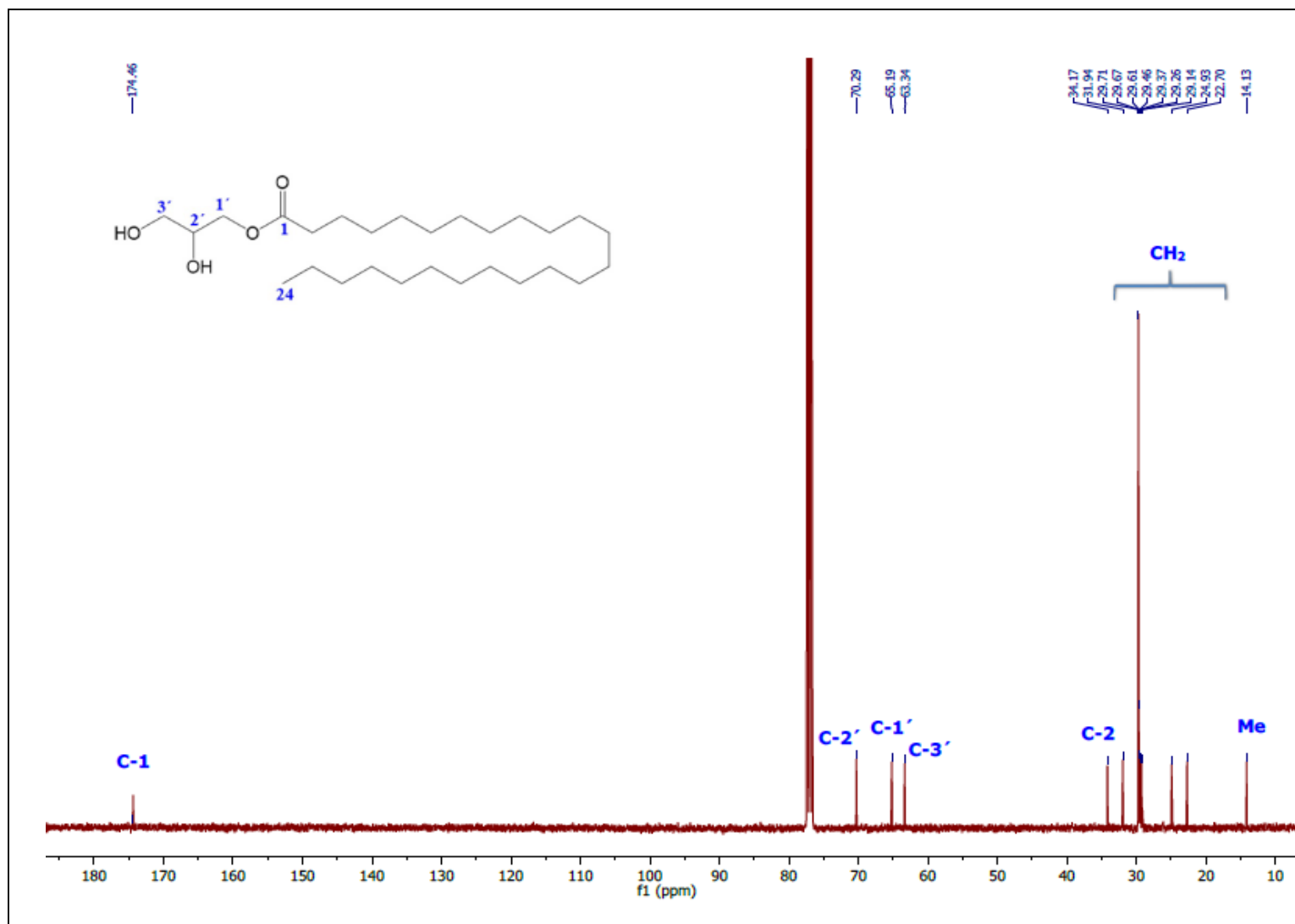


Figura 17. Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) de tetracosanoato de 2,3-dihidroxipropilo (**CIH-7**)

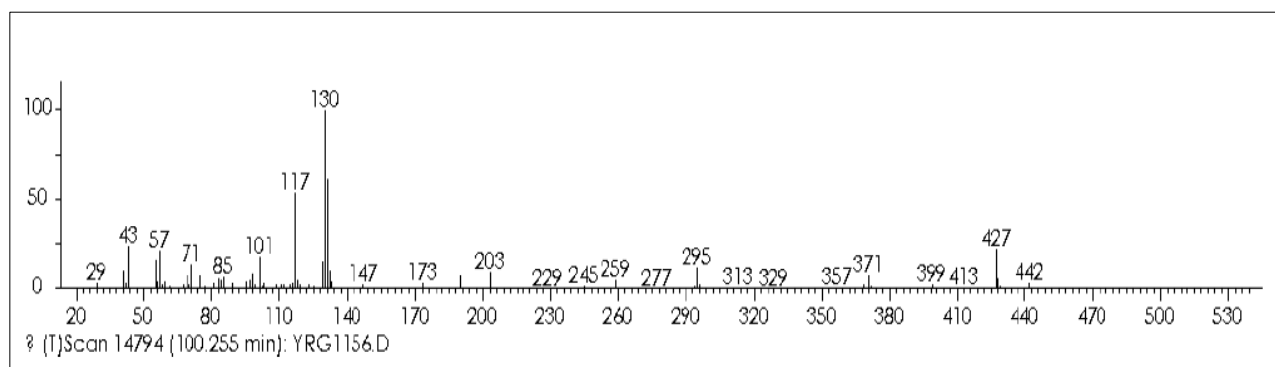


Figura 18. Espectro de EM-IE de tetracosanoato de 2,3-dihidroxiopilo (**CIH-7**)

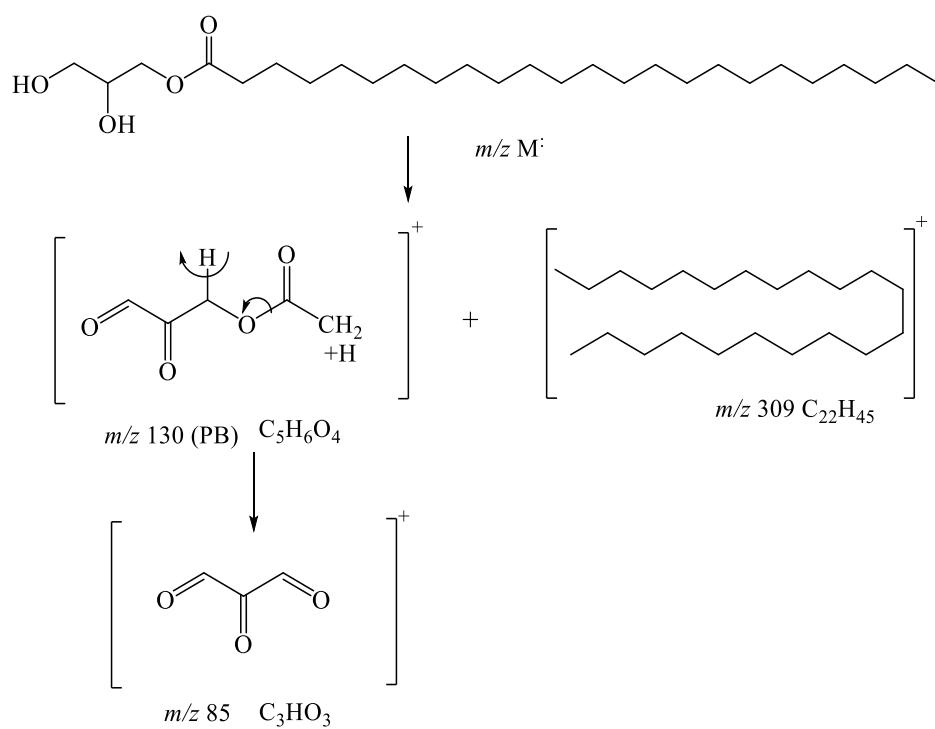


Figura 19. Mecanismo de fragmentación de **CIH-7** con la obtención del pico base

Tabla 13. Comparación de datos espectroscópicos de **CIH-7** con monoglicerol de *I. sonorae*

Posición	RMN ¹ H		RMN ¹³ C	
	(CDCl ₃ , 300 MHz) δ (ppm) Reportados ⁹²	(CDCl ₃ , 400 MHz) δ (ppm) Obtenidos	(CDCl ₃ , 75 MHz) δ (ppm) Reportados ⁹²	(CDCl ₃ , 100 MHz) δ (ppm) Obtenidos
1	-	-	174.5	174.46
2	2.33 (t, <i>J</i> (Hz)=7.5)	2.35 (t, <i>J</i> (Hz)=7.48)		
CH ₂	1.25 (sa)	1.25 (sa)	22.5 - 31.8	22.7 - 34.17
Me	0.88 (t, <i>J</i> (Hz)=7.2)	0.88 (t, <i>J</i> (Hz)=6.84)	14.1	14.13
1'α	4.19 (dd, <i>J</i> (Hz)=11.4, 4.9)	4.21 (dd, <i>J</i> (Hz)=11.64, 4.6)	65.1	65.19
1'β	4.14 (dd, <i>J</i> (Hz)=11.5, 6.0)	4.14 (dd, <i>J</i> (Hz)=11.64, 6.08)		
2'	3.93 (m)	3.93 (m)	70.2	70.29
3'α	3.70 (dd, <i>J</i> (Hz)=11.5, 4.0)	3.69 (dd, <i>J</i> (Hz)=11.34, 4.1)	63.3	63.34
3'β	3.59 (dd, <i>J</i> (Hz)=11.5, 6.0)	3.61 (dd, <i>J</i> (Hz)=11.4, 5.6)		

5.1.2.4 Propiedades físicas y espectroscópicas de β-sitosterol (CIH-2)

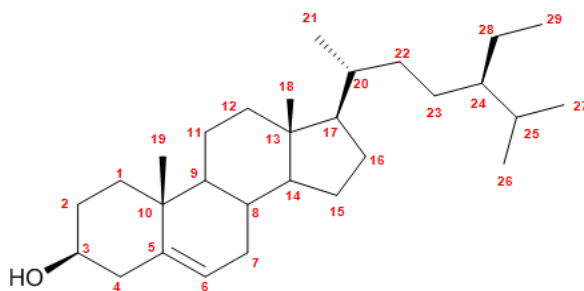


Figura 20. Estructura de β-sitosterol (**CIH-2**)

β-sitosterol (Figura 20): sólido blanco amorfo, soluble en cloroformo, pf 139-141°C, C₂₉H₅₀O, PM_{calc} 414.30 g/mol. IR_v (cm⁻¹): 3490, 2997, 2880, 1670, 1460, 1340, 1030, 960. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.70 (s, 3H, Me-18), 0.84 (d, *J*=6.88 Hz, 3H, Me-27), 0.86 (d, *J*=7.2 Hz,

3H, Me-26), 0.87 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, Me-29), 0.95 (d, $J=6.56$ Hz, 3H, Me-21), 1.03 (s, 3H, Me-19), 3.54 (m, 1H, H-3), 5.38 (m, 1H, H-6). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 11.60 (C18), 11.78 (C29), 18.58 (C27), 18.83 (C21), 19.20 (C19), 19.62 (C26), 20.89 (C11), 22.87 (C28), 24.11 (C15), 25.88 (C23), 28.05 (C16), 28.95 (C25), 31.47 (C2), 31.71 (C7 y C8), 33.75 (C22), 35.95 (C20), 36.31 (C10), 37.06 (C1), 39.58 (C12), 42.11 (C13), 42.13 (C4), 45.64 (C24), 49.94 (C9), 55.86 (C17), 56.57 (C14), 71.62 (C3), 121.53 (C6), 140.56 (C5).

5.1.2.4.1 Elucidación estructural de β -sitosterol (CIH-2)

El espectro de IR (Figura 21) muestra una banda a 3490 cm^{-1} correspondiente a O-H de estiramiento de un grupo hidroxilo, en 2997 cm^{-1} y 2880 cm^{-1} bandas de C-H de estiramiento de una parte alifática de la molécula, en 1640 cm^{-1} C=C de estiramiento, en 1460 cm^{-1} O-H de flexión, 1340 cm^{-1} C-H de flexión, 1030 cm^{-1} C-O de estiramiento y en 660 cm^{-1} (=C-H) de flexión.

Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de CIH-2 mostraron un perfil de señales características de estructuras relacionadas a fitoesteroides. En el espectro de RMN ^1H (Figura 22) se observó un patrón complejo de señales, en la región de campo alto ($\delta = 0.7\text{-}1.2$ ppm), destacan las señales de mayor intensidad atribuibles a seis grupos metilos δ (ppm): 0.70 (Me-18), 0.84 (Me-27), 0.86 (Me-26), 0.87 (Me-29), 0.95 (Me-21), y 1.03 (Me-19). Otras de las señales características se encontraron en 3.54 ppm, un multiplete del hidrógeno unido al carbono unido a un grupo hidroxilo, además del doblete ancho en δ 5.38 ppm del hidrógeno olefínico H-6. Mediante el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 23) se pudieron confirmar los seis grupos metilos los cuales mostraron señales en δ (ppm): 11.66 (C18), 11.78 (C29), 18.58 (C27), 19.20 (C19), 19.62 (C26), 18.83 (C21). Los carbonos restantes de RMN ^{13}C se atribuyen a once grupos metilenos y a nueve grupos metinos, de los cuales dos corresponden a los carbonos de la doble ligadura δ (ppm): 121.53 (C6), 140.56 (C5), y uno es

base de un grupo hidroxilo en δ 71.62 ppm (C3). Los resultados obtenidos son congruentes con los datos espectroscópicos reportados en la literatura.⁹³ Al compararlos, permite establecer la identidad de CIH-2 como β -Sitosterol (Ver Apéndices). Este compuesto tiene 50 hidrógenos según su fórmula molecular $C_{29}H_{50}O$; sin embargo, el total de señales en el espectro de RMN 1H integran para un total de cincuenta y tres protones, lo cual nos indicó que existe una mezcla de compuestos. Por lo que se procedió a acetilar y analizar por CG-EM. Las señales que aparecen en 5.03 y 5.17 pudieran deberse a la presencia de un doble enlace correspondiente al estigmasterol. Aunque calculando la proporción de la mezcla por la contribución de los hidrógenos en RMN 1H , esta fue de 90:10, resultando el β -sitosterol el compuesto mayoritario.

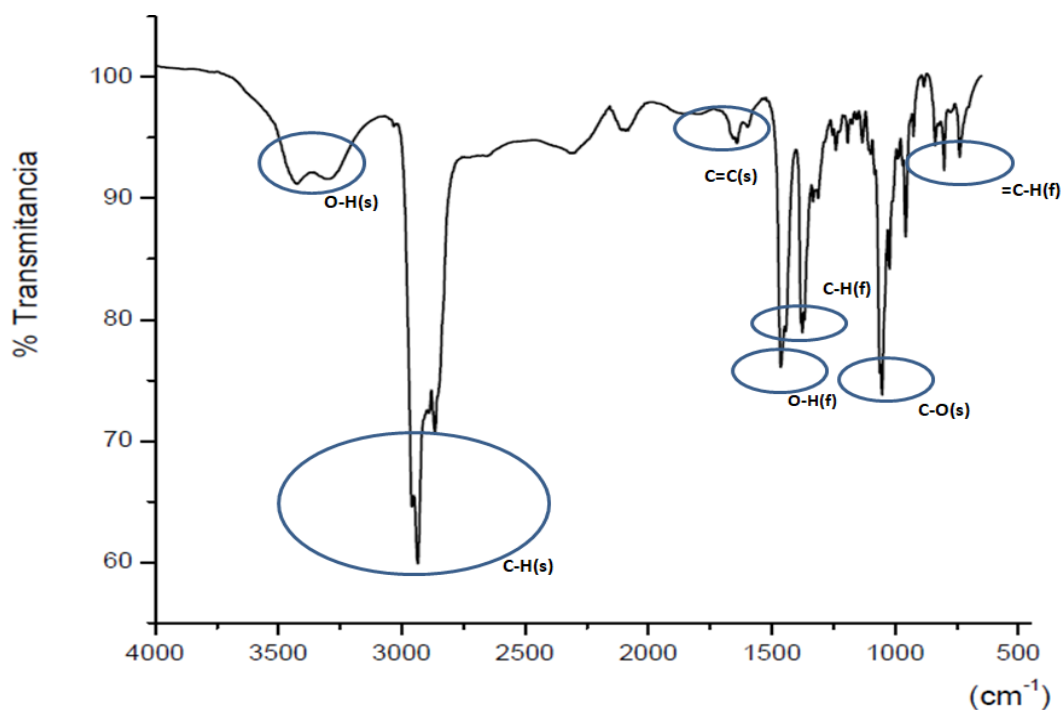


Figura 21. Espectro IR del β -sitosterol (CIH-2)

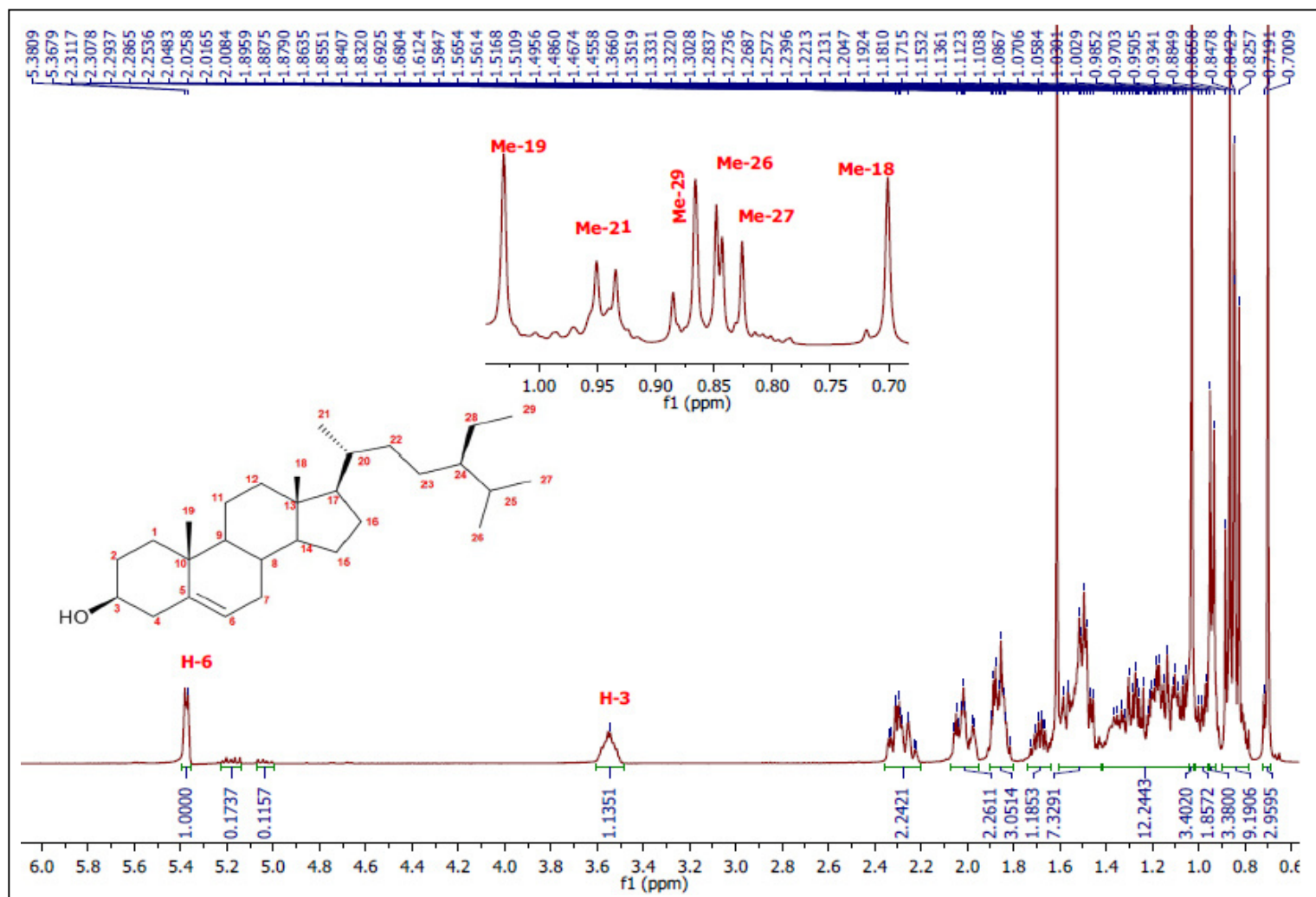


Figura 22. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) del β -sitosterol (CIH-2)

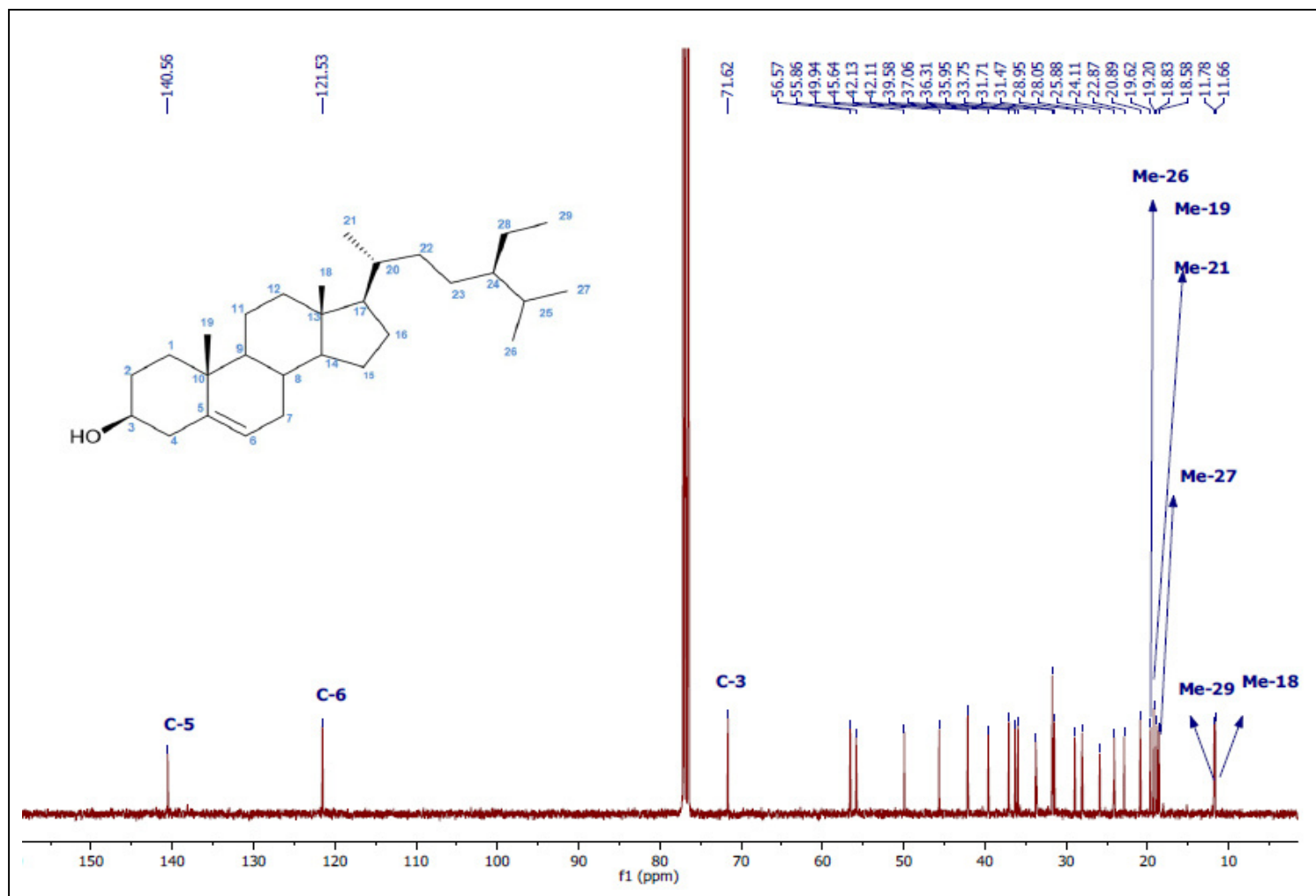


Figura 23. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) del β -sitosterol (CIH-2)

5.1.2.5 Propiedades físicas y espectroscópicas de acetato de β -sitosterilo (CIH-2Ac)

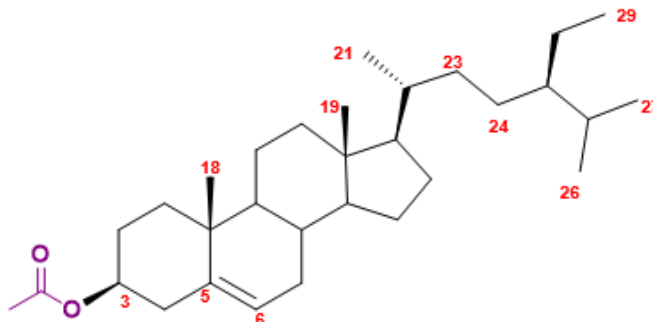


Figura 24. Estructura de acetato de β -sitosterilo (CIH-2Ac)

Acetato de β -sitosterilo (Figura 24): cristales en forma de aguja, $C_{31}H_{52}O_2$, PM_{calc} 456.40 g/mol, soluble en cloroformo. pf: 118-120°C, RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 0.70 (s, 3H, Me-18), 0.84 (d, $J=7.56$ Hz, 3H, Me-27), 0.86 (d, $J=8.08$ Hz, 3H, Me-26), 0.87 (t, $J=7.84$ Hz, 3H, Me-29), 0.94 (d, $J=6.24$ Hz, 3H, Me-21), 1.04 (s, 3H, Me-19), 2.06 (s, 3H, $\underline{CH_3CO}$) 4.64 (m, 1H, H-3), 5.40 (da, 1H, H-6). RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 11.87 (C18), 12.00 (C29), 18.74 (C28), 19.04 (C19), 19.32 (C26), 19.83 (C21), 21.04 ($\underline{CH_3CO}$), 21.46 (C11), 23.08 (C25), 24.3 (C15), 27.79 (C16), 28.26 (C2), 29.16 (C27), 31.87 (C8), 31.91 (C7), 36.17 (C20), 36.61 (C10), 37.00 (C1), 38.13 (C4), 39.73 (C12), 42.33 (C13), 45.85 (C24), 50.04 (C9), 56.04 (C17), 56.7 (C14), 74.00 (C3), 122.66 (C6), 139.67 (C5), 170.56 ($\underline{CH_3CO}$).

5.1.2.5.1 Elucidación estructural del acetato de β -sitosterilo (CIH-2Ac)

El espectro de RMN ^1H del acetato de β -sitosterilo (Figura 25), mostró en la región de campo alto un patrón de señales muy similar al espectro del β -sitosterol (CIH-2). En dicha región se puede observar la presencia de seis grupos metilos δ (ppm): 0.70 (Me-18), 0.84 (Me-27), 0.86 (Me-26), 0.87 (Me-29), 0.95 (Me-21), 1.04 (Me-19) y de un singulete en 2.06 ppm que corresponde al metilo del grupo acetilo en la posición 3. Se observó la señal del protón H-3, que comparándola con la del espectro de CIH-2, se encuentra desplazada a campos más bajos apareciendo en δ 4.64 ppm al estar geminal a un grupo éster. De igual forma se observó un doblete ancho δ 5.37 (da, $J=4.64$, 1H, H-6) que corresponde al hidrógeno olefínico H-6. Todas las señales fueron confirmadas en el espectro de RMN ^{13}C (Figura 26) apreciándose las señales características del grupo acetato en δ 21.04 ppm (CH_3CO) y en δ 170.56 ppm ($\text{CH}_3\text{C}\text{O}$). También se observaron las seis señales de los metilos en δ (ppm): 11.87 (C18), 12.00 (C29), 19.04 (C19), 19.32 (C26), 19.83 (C21), 29.16 (C27), y las señales de los carbonos de la doble ligadura en δ (ppm): 122.66 (C6) y 139.67 (C5). Se apreció el desplazamiento a campo bajo del (C3) apareciendo en δ 74.00 ppm. Estos datos espectroscópicos se compararon con los reportados previamente por Yang *et al.*⁹⁴ pudiéndose confirmar el compuesto mayoritario de CIH-2Ac como acetato de β -sitosterilo (ver tabla en Apéndices). Sin embargo, el espectro de RMN ^1H muestra en δ 5.04 y 5.18 ppm señales que pueden atribuirse al estigmasterol, pues corresponden al doble de dobles para los hidrógenos H-23 y H-24 que se esperaba observar en esa región.

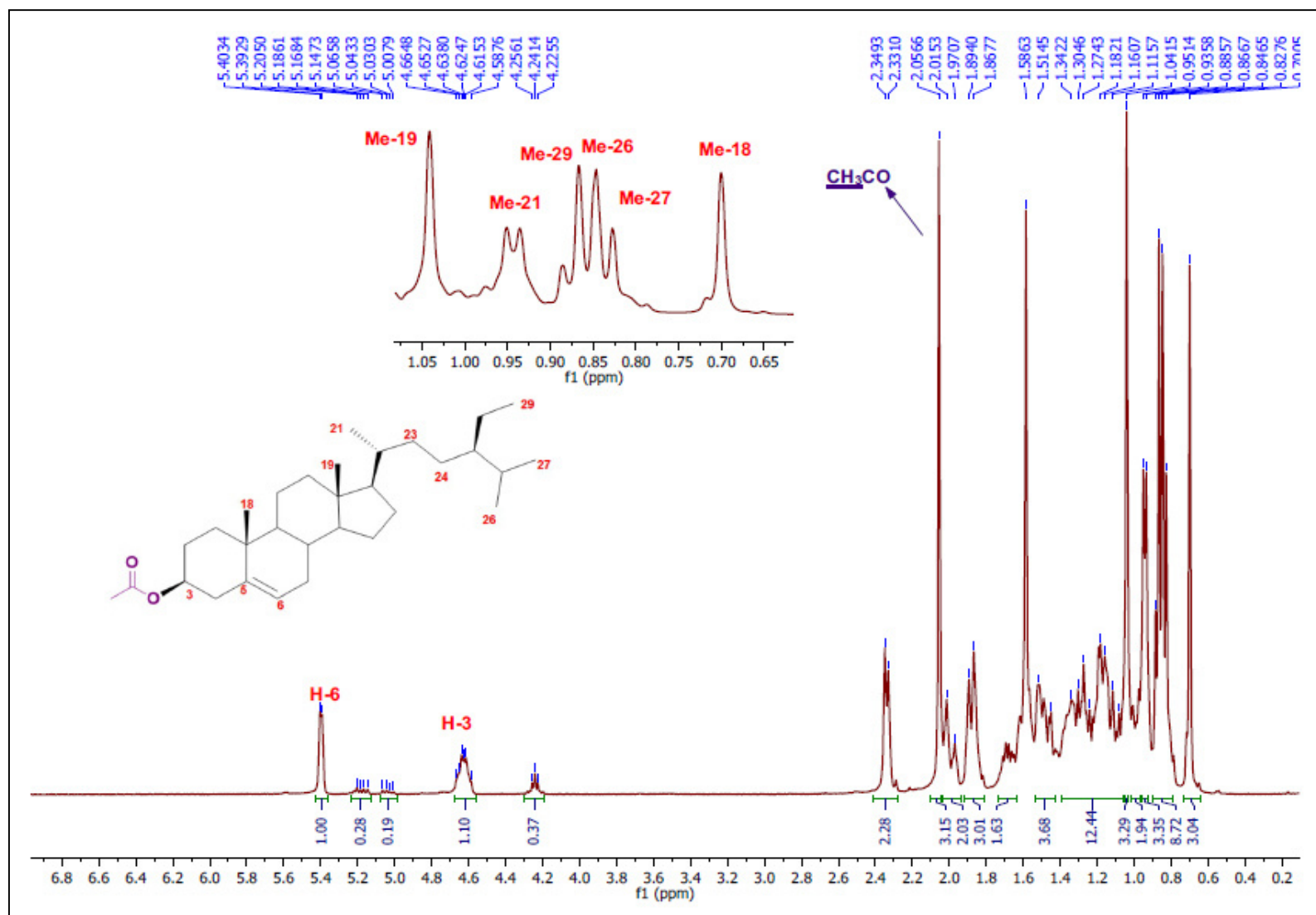


Figura 25. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl₃) de acetato de β-sitosterilo (CIH-2Ac)

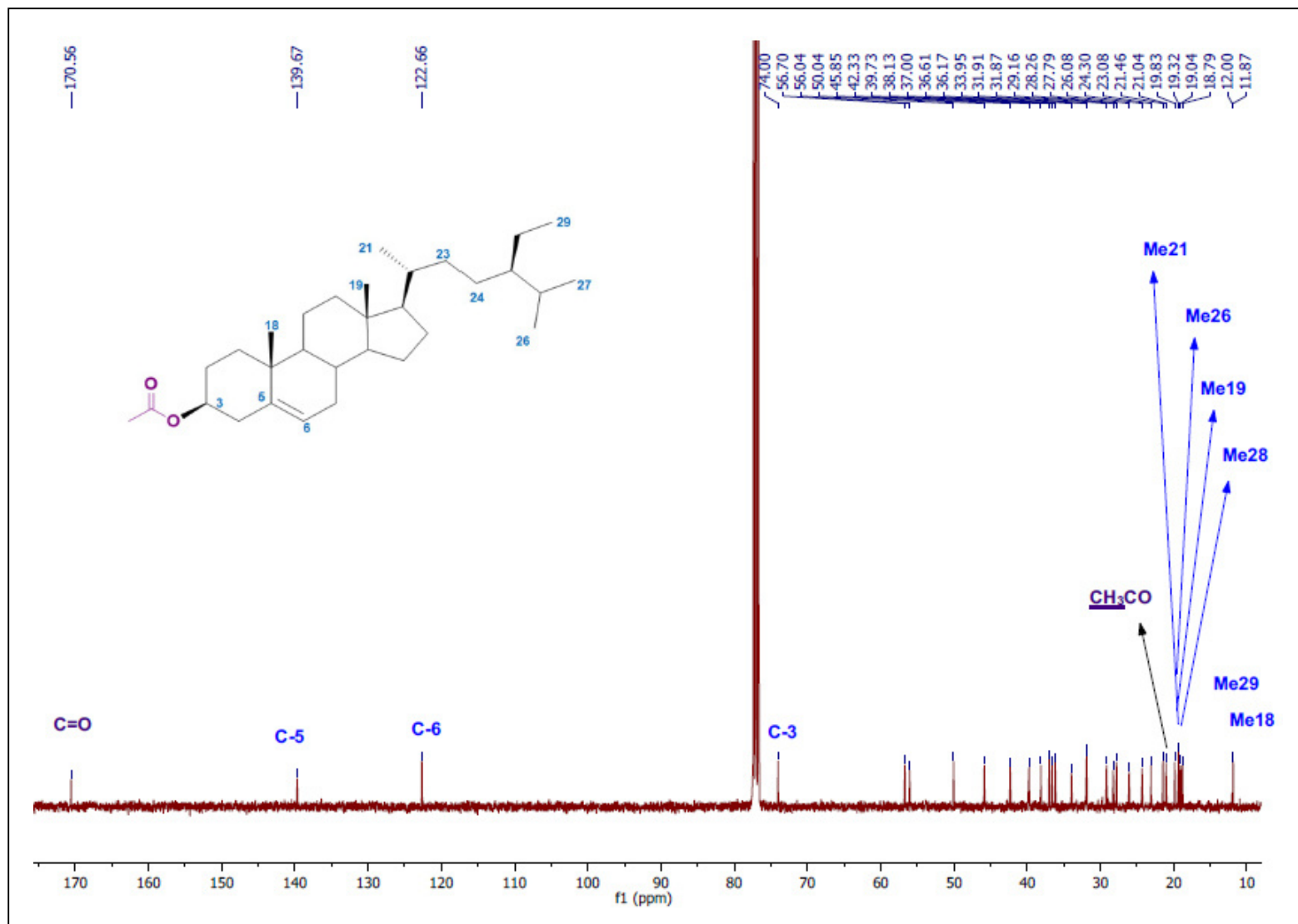


Figura 26. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de acetato de β -sitosterilo (CIH-2Ac)

Estos resultados concuerdan plenamente con el reporte de Kojima *et al.*⁹³, al ser esta mezcla de esteroides muy comúnmente hallada entre los metabolitos secundarios de las plantas. La misma ha sido caracterizada puesto que su separación por métodos cromatográficos tradicionales aún resulta difícil de lograr.⁹³ La Tabla 14 muestra los datos espectroscópicos obtenidos junto con los reportados para β -sitosterol y estigmasterol. La proporción de estos últimos de acuerdo a la contribución de las señales es 90:10, ratificando a β -sitosterol como compuesto mayoritario. Además, al realizar la acetilación no se observaron señales adicionales en el espectro de RMN¹³C en la parte de carbonos de doble ligadura.

Tabla 14. Datos espectroscópicos de β -sitosterol, estigmasterol y CIH-2

	β -sitosterol ⁹³	estigmasterol ⁹³	Resultados obtenidos (CIH-2)
Posición	¹ H		
3	3.52 (m)	3.52 (m)	3.54 (m)
6	5.35 (m)	5.35 (m)	5.38 (m)
Me-18	0.68 (s)	0.69 (s)	0.70 (s)
Me-19	1.01(s)	1.01 (s)	1.03(s)
Me-21	0.92 (d, (J=6.5 Hz)	1.02 (d, (J=6.5 Hz)	0.95 (d, J=6.56 Hz)
22	-	5.15 (dd, J=15.9Hz)	-
23	-	5.01 (dd, J=15.9Hz)	-
Me-26	0.83 (d, (J=6.5 Hz))	0.84 (d, J=6.5 Hz)	0.86 (d, J=7.2 Hz)
Me-27	0.81 (d, (J=6.5 Hz))	0.79 (d, J=6.5 Hz)	0.84 (d, J=6.9 Hz)
Me-29	0.84 (t, J=7.5 Hz))	0.80 (t, J=7.5 Hz)	0.87 (t, J=7.2 Hz)
Posición	¹³ C		
3	71.8	71.8	71.62
6	121.7	29.6	121.53
18	11.9	12.0	11.66
19	19.4	19.4	19.20
21	18.8	21.2	18.83
22	33.9	138.3	33.75
23	26.0	129.2	25.88
26	19.8	21.10	19.62
27	19.0	19.0	18.58
29	12.0	12.3	11.78

5.1.2.6 Propiedades físicas y espectroscópicas de β -D-glucopiranosido de β -sitosterol

(CIH-8)

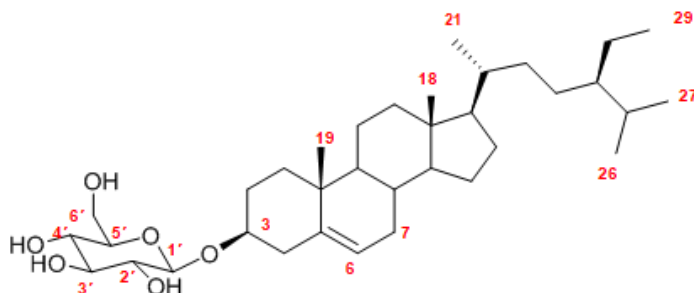


Figura 27. Estructura de β -D-glucopiranosido de β -sitosterol (CIH-8)

β -D-glucopiranosido de β -sitosterol (estructura en la Figura 27): sólido blanco amorfo, soluble en DMSO, $p_f > 280^\circ\text{C}$, $\text{C}_{35}\text{H}_{60}\text{O}_6$, $\text{PM}_{\text{calc.}}$ 576.44 g/mol. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 0.66 (s, 3H, Me-18), 0.80 (d, $J=7.08$ Hz, 3H, Me-27), 0.82 (d, $J=7.0$ Hz, 3H, Me-26), 0.83 (t, $J=6.66$ Hz, 3H, Me-29), 0.91 (d, $J=5.88$ Hz, 3H, Me-21), 0.96 (s, 3H, Me-19), 2.90 (m, 1H, H-2'), 3.02 (m, 1H, H-5'), 3.05 (m, 1H, H-4'), 3.12 (m, 1H, H-3'), 3.39 (m, 1H, H-6' β), 3.47 (m, 1H, H-3), 3.64 (m, 1H, H-6' α), 4.22 (d, $J=7.68$ Hz, 1H, H-1'), 4.44 (t, $J=5.64$ Hz, 1H, OH-6'), 4.89 (m, 3H, OH-4', OH-2', OH-3'), 5.34 (sa, 1H, H-6). RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 12.15 (C18), 12.26 (C29), 19.09 (C21), 19.41 (C27), 19.58 (C19), 20.19 (C26), 21.03 (C11), 23.08 (C28), 24.34 (C15), 25.90 (C23), 28.27 (C16), 29.17 (C25), 29.74 (C2), 31.85 (C8), 31.89 (C7), 33.82 (C22), 35.96 (C20), 36.69 (C10), 37.30 (C1), 37.43 (C12), 38.78 (C4), 42.33 (C13), 45.61 (C24), 50.07 (C9), 55.90 (C14), 56.65 (C17), 61.56 (C6'), 70.57 (C4'), 73.93 (C2'), 77.23 (C3 y C3'), 77.37

(C5'), 101.25 (C1'), 121.68 (C6), 141.03 (C5).

5.1.2.6.1 Elucidación estructural de β -D-glucopiranosido de β -sitosterol (CIH-8)

En el espectro de RMN ^1H (Figura 28), se observaron las señales características para la aglicona del β -sitosterol: seis metilos, δ (ppm): 0.66 (Me-18), 0.80 (Me-27), 0.82 (Me-26), 0.83 (Me-29), 0.91 (Me-21), 0.96 (Me-19); un multiplete de hidroximetino en δ 3.45 ppm y un singulete ancho en δ 5.34 ppm del hidrógeno olefínico H-6. Además se observaron señales de hidrógenos geminales a grupos hidroxilos en la región entre δ 2.87- 4.22 ppm que indicaron que la presencia de un glucósido⁹³ y las señales obtenidas del espectro de doble dimensión COSY(Figura 29), ayudaron a establecer las correlaciones entre los hidrógenos correspondientes a la glucosa 3'/4' (δ_{H} 3.12/ δ_{H} 3.05), 1'/2' (δ_{H} 4.22/ δ_{H} 2.90), 2'/3' (δ_{H} 3.12/ δ_{H} 2.90), 4'/5' (δ_{H} 3.05/ δ_{H} 3.02), 5'/6' α (δ_{H} 3.02/ δ_{H} 3.64), 5'/6' β (δ_{H} 3.02/ δ_{H} 3.39). Adicionalmente, la presencia de la glucosa unida al β -sitosterol se corroboró por las señales presentes en el espectro de RMN ^{13}C , δ : 61.56 (C6'), 70.57 (C4'), 73.93 (C2'), 77.23 (C3'), 77.37 (C5') ver Figura 30. Utilizando el experimento HSQC (Figura 31) pudo relacionarse la señal a δ 4.22 que es un doblete ($J=7.68$ Hz) perteneciente al protón anomérico con su correspondiente carbono δ 101.25 (C1'), de igual forma se conectaron los protones con sus carbonos, tal y como lo reflejan los datos de la Tabla 16. El espectro HMBC mostró correlaciones entre las señales del protón anomérico H-1' y con el carbón C3 de la aglicona que valida la unión de la aglicona con la glucosa. Otra importante correlación HMBC se obtuvo entre protones del metilo 19 y C-5 (indicados en la Figura 32) confirmando la posición de la doble ligadura entre el carbono 5 y 6 de la aglicona. Los datos espectroscópicos obtenidos de los análisis fueron corroborados con lo reportado en la literatura⁹⁵ (ver Tabla 15) indicando la presencia del β -D-glucopiranosido de β -sitosterol.

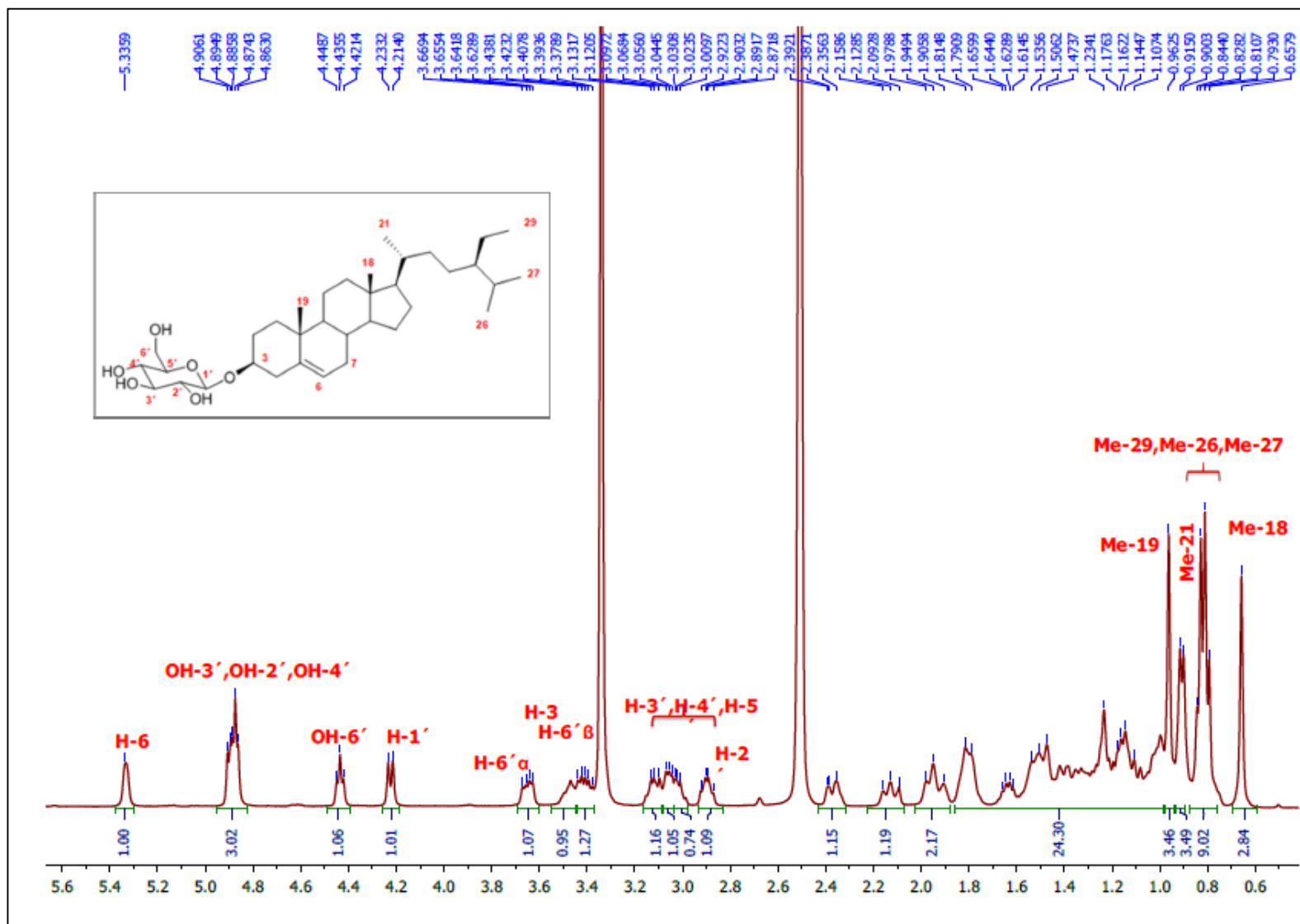


Figura 28. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de β -D-glucopiranosido de β -sitoterol (CIH-8)

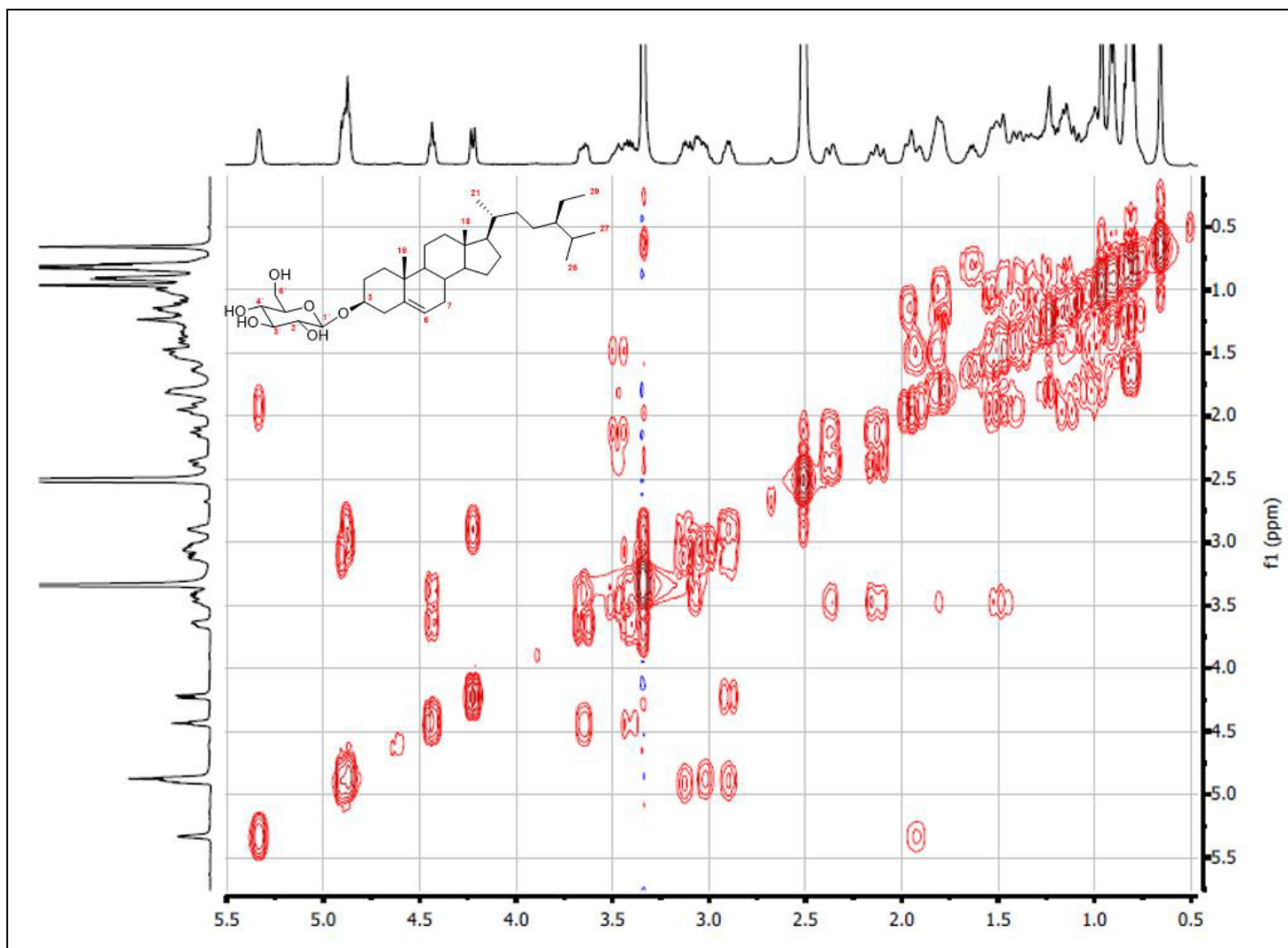


Figura 29. Espectro COSY de β -D-glucopiranosido de β -sitosterol (CIH-8)

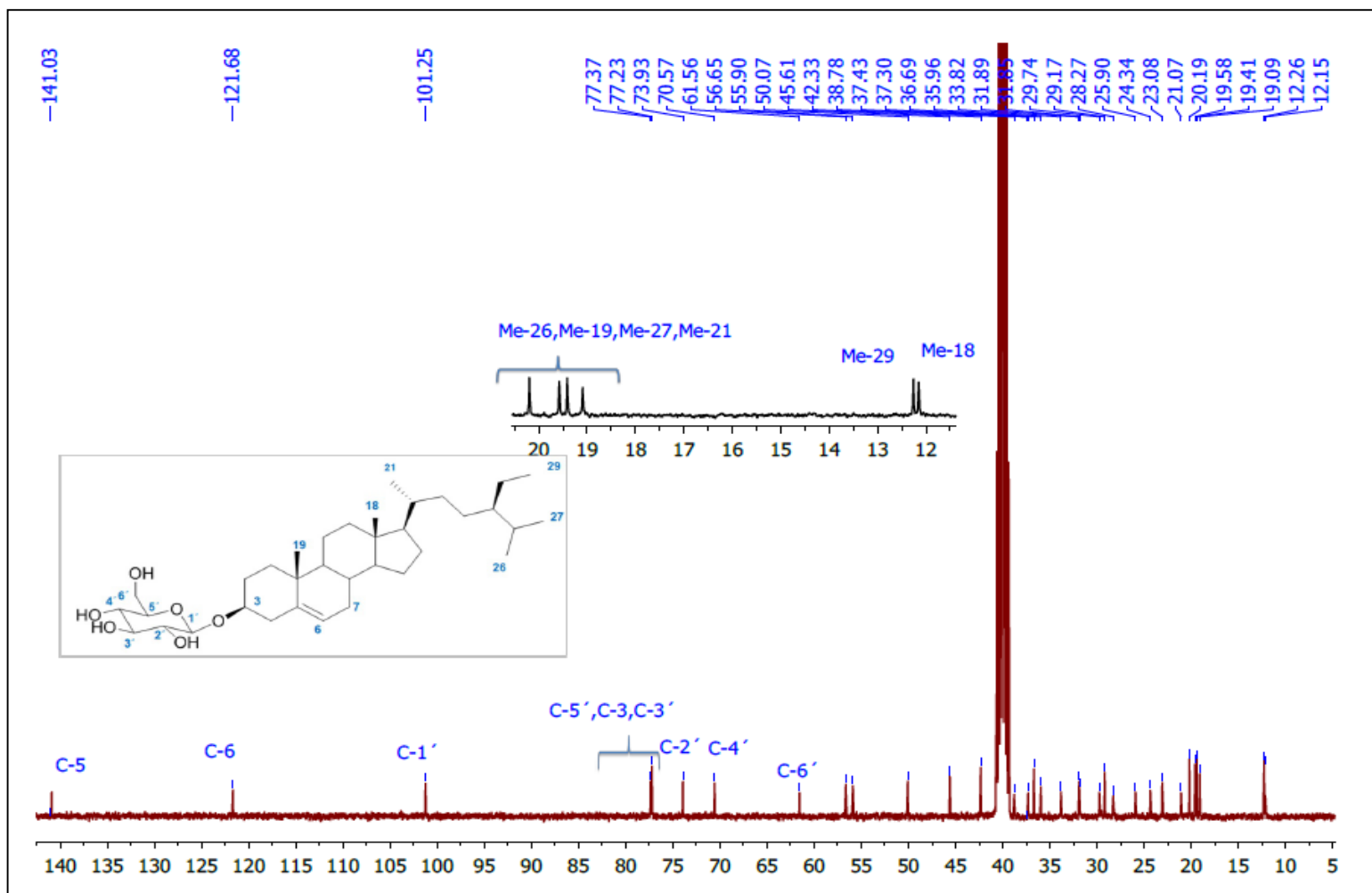


Figura 30. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de β -D-glucopiranosido de β -sitosterol (CIH-8)

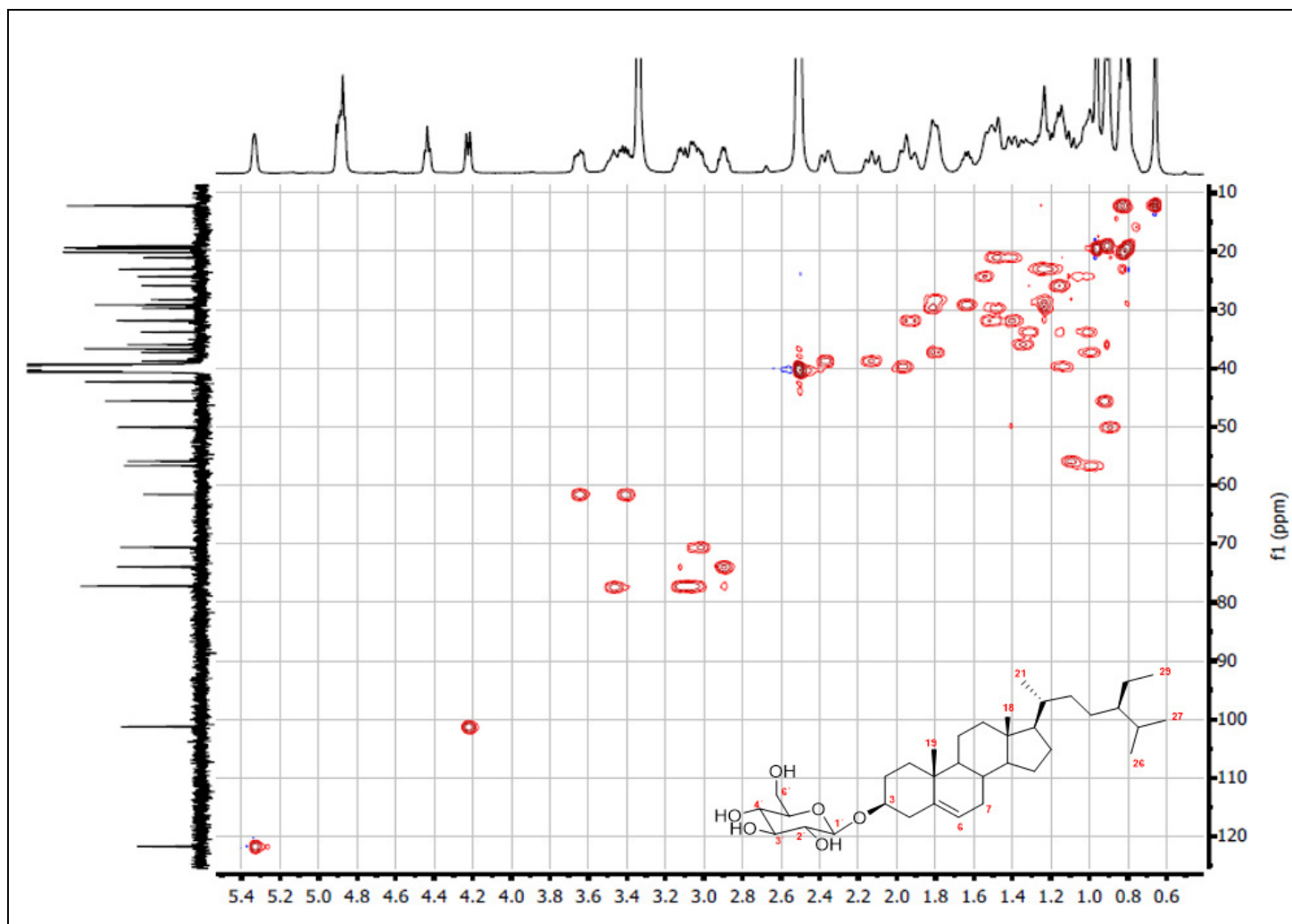


Figura 31. Espectro HSQC de β -D-glucopiranósido de β -sitosterol (CIH-8)

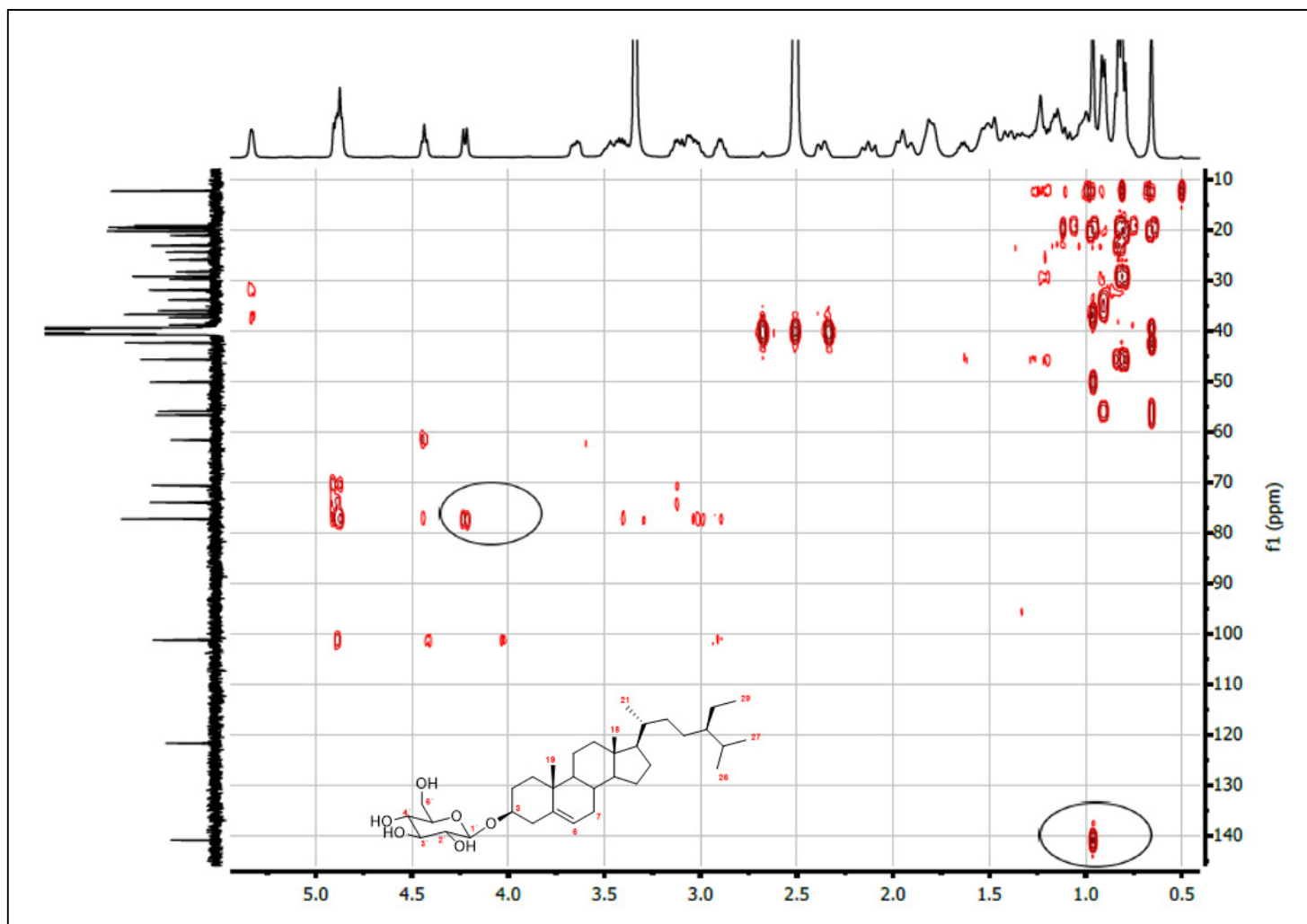


Figura 32. Espectro HMBC de β -D-glucopiranosido de β -sitosterol (CIH-8)

Tabla 15. Comparación de datos espectroscópicos de **CIH-8** con β -D-glucopiranosido de β -sitosterol aislado de *Lansea kerstingii*

Posición	RMN ^1H (DMSO- <i>d</i> 6, 400 MHz)		RMN ^{13}C (DMSO- <i>d</i> 6, 125 MHz)	RMN ^{13}C (DMSO- <i>d</i> 6, 100 MHz)
	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
	Reportados ⁹⁵	Obtenidos	Reportados ⁹⁵	Obtenidos
1			38.75	37.30
2			29.15	29.74
3	3.37	3.46	77.42	77.23
4			39.55	38.78
5			140.90	141.03
6	5.35	5.33	121.83	121.68
7			31.84	31.89
8			31.80	31.85
9			50.01	50.07
10			37.29	36.69
11			21.06	21.07
12			39.34	37.43
13			42.32	42.33
14			55.92	55.90
15			24.33	24.34
16			28.27	28.27
17			56.69	56.65
18	0.65 (3H,s)	0.66 (3H,s)	12.16	12.15
19	0.96 (3H,s)	0.96 (3H,s)	19.10	19.58
20			36.68	35.96
21	0.90 (3H, d, $J=7.2\text{Hz}$)	0.90 (3H, d, $J=5.88\text{Hz}$)	-	19.09
22			33.76	33.82
23			25.86	25.90
24			45.59	45.61
25			31.84	29.17
26	0.8 (3H, m)	0.81 (d, 3H, $J=7.0\text{Hz}$)	20.20	20.19
27	0.79 (3H, m)	0.80 (d, 3H, $J=7.1\text{Hz}$)	19.58	19.41
28			23.05	23.08
29	0.85 (3H, m)	0.82 (t, 3H, $J=6.7\text{Hz}$)	12.28	12.26
1'	4.24 (m, 1H)	4.22 (d, 1H, $J=7.7\text{Hz}$)	101.41	101.25
2'			74.09	73.93
3'			77.42	77.23
4'			70.54	70.57
5'			77.42	77.37
6'			61.55	61.56

5.1.2.7 Propiedades físicas y espectroscópicas de β -D-tetraacetil glucopiranosido de β -sitosterilo (CIH-8Ac)

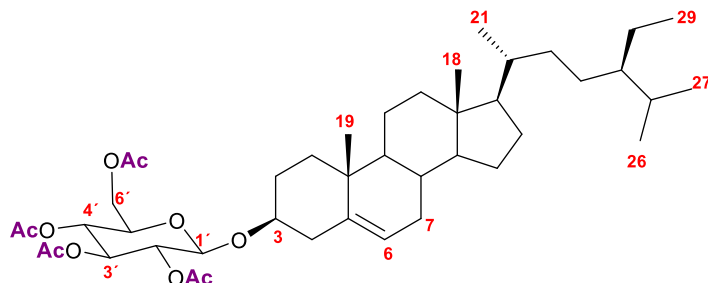


Figura 33. Estructura de β -D-tetraacetil glucopiranosido de β -sitosterilo (CIH-8Ac)

β -D-tetraacetil glucopiranosido de β -sitosterilo (estructura mostrada en la Figura 33): cristales en forma de aguja, soluble en CHCl_3 , pf 144-147°C, $\text{C}_{43}\text{H}_{68}\text{O}_{10}$, $\text{PM}_{\text{calc.}}$ 744.48 g/mol. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.70 (s, 3H, Me-18), 0.83 (d, $J=8.04$ Hz, 3H, Me-26), 0.85 (d, $J=7.88$ Hz, 3H, Me-27), 0.86 (t, $J=7.7$ Hz, 3H, Me-29), 0.94 (d, $J=6.64$ Hz, 3H, Me-21), 1.00 (s, 3H, Me-19), 2.03 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO}-2'$), 2.04 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO}-3'$), 2.07 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO}-4'$), 2.10 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO}-6'$), 3.5 (m, 1 H, H-3), 3.69 (da, $J=7.72$ Hz, 1H, H-5'), 4.13 (d, $J=11.96$ Hz, 1H, H-6' β), 4.26 (dd, $J=12.16$, 4.44 Hz, 1H, H-6' α), 4.61 (d, $J=7.96$ Hz, 1H, H-1'), 4.98 (t, $J=8.74$ Hz, 1H, H-2'), 5.10 (t, $J=9.62$ Hz, 1H, H-4'), 5.23 (t, $J=9.46$ Hz, 1H, H-3'), 5.38 (m, 1H, H-6). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 11.86 (C18), 11.99 (C29), 18.79 (C21), 19.04 (C26), 19.37 (C27), 19.83 (C19), 20.63 ($\text{CH}_3\text{CO}-6'$), 20.66 ($\text{CH}_3\text{CO}-2'$), 20.74 ($\text{CH}_3\text{CO}-3'$), 20.78 ($\text{CH}_3\text{CO}-4'$), 21.05 (C11), 23.08 (C28), 24.30 (C15), 26.06 (C23), 28.25 (C16), 29.15 (C25), 29.46 (C-2), 31.87 (C8), 31.95 (C7), 33.95 (C22), 36.14 (C20), 36.73 (C10), 37.20 (C1), 38.93 (C4), 39.75 (C12), 42.33 (C13), 45.84 (C24), 50.17 (C9), 56.06 (C17), 56.76 (C14), 62.12 (C6'), 68.55 (C4'), 71.50 (C2'), 71.70 (C5'),

72.93 (C3'), 80.10 (C3), 99.66 (C1'), 122.18 (C6), 140.37 (C5), 169.32 (CH₃CO-4'), 169.42 (CH₃CO-2'), 170.38 (CH₃CO-3'), 170.73 (CH₃CO-6').

5.1.2.7.1 Elucidación estructural de β-D-tetraacetil glucopiranosido de β-sitosterilo

(CIH-8Ac)

El espectro de RMN ¹H (Figura 34) mostró datos espectroscópicos similares al β-D-glucopiranosido de β-sitosterilo, estos fueron: seis señales a campos altos correspondientes a seis metilos, en δ (ppm): 0.70 (Me-18), 0.83 (Me-26), 0.85 (Me-27), 0.86 (Me-29), 0.94 (Me-21), 1.00 (Me-19) y un doblete ancho en δ 5.38 ppm correspondiente al protón olefinico H-6. De forma adicional se observaron cuatro singuletes de grupos acetilo del azúcar acetilada δ (ppm): 2.03 (CH₃CO-2'), 2.04 (CH₃CO-3'), 2.07 (CH₃CO-4'), 2.10 (CH₃CO-6'), siete hidrógenos base de grupo éster δ: 3.70 (H-5'), 4.98 (H-2'), 5.10 (H-4'), 5.23 (H-3'), 4.13 (d, J=11.96 Hz, H-6'β) y 4.26 (dd, J=12.16, 4.44 Hz, H-6'α), mientras que el protón anomérico (H-1') resonó en 4.61 ppm con una J=7.96 Hz confirmando la orientación β de la glucosa por el acoplamiento axial-axial con el protón H-2'. Mediante el espectro COSY (Figura 35) se obtuvieron valiosas correlaciones entre los protones de la glucosa 3'/4' (δ_H 5.23/δ_H 5.10), 1'/2' (δ_H 4.61/δ_H 4.98), 4'/5' (δ_H 5.10/δ_H 3.70), 5'/6'α (δ_H 3.70/δ_H 4.26), 5'/6'β (δ_H 3.70/δ_H 4.13). Otras importantes correlaciones fueron confirmadas, esta vez con el experimento HMBC, donde quedó bien establecida la interacción H-1' con C-3, así como Me-19 con el C-5 (ambas señaladas en la Figura 37). Se confirma la acetilación de la glucosa con el espectro de RMN ¹³C (Figura 36), al observar las señales de los cuatro metilos unidos al grupo carbonilo del éster en δ (ppm): 20.63 (CH₃CO-6'), 20.66 (CH₃CO-2'), 20.74 (CH₃CO-3'), 20.78 (CH₃CO-4'), y los cuatro carbonilos de éster en δ (ppm): 169.32 (CH₃CO-4'), 169.42 (CH₃CO-2'), 170.38 (CH₃CO-3') y 170.73 (CH₃CO-6'). Los datos

espectroscópicos de este derivado coinciden con los datos previamente reportados por Peshin *et al.*⁹⁶ (Tabla 16).

Tabla 16. Comparación de datos espectroscópicos de **CIH-8Ac** con análogo reportado⁹⁶

Posición	RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz)	RMN ¹ H (CDCl ₃ ,400 MHz)	RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz)	RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz)
	δ (ppm), <i>J</i> (Hz) Reportados ⁹⁶	δ (ppm), <i>J</i> (Hz) Obtenidos	δ (ppm) Reportados	δ (ppm) Obtenidos
1'	4.65 (d, <i>J</i> =8.0)	4.61 (d, <i>J</i> =7.96)	104.20	99.65
2'	4.98 (dd, <i>J</i> =8.0, 9.6)	4.98 (t, <i>J</i> =8.74)	71.59	71.50
3'	5.54 (t, <i>J</i> =9.6)	5.23 (t, <i>J</i> =9.46)	72.99	72.93
4'	5.35 (t, <i>J</i> =9.6)	5.10 (t, <i>J</i> =9.62)	68.66	68.55
5'	3.65 (ddd, <i>J</i> =2.5, 4.8, 9.5)	3.70 (da, <i>J</i> =7.72)	72.76	71.70
6'α	4.34 (dd, <i>J</i> =4.8, 12.30)	4.26 (dd, <i>J</i> =4.44, 12.16)	62.4	62.12
6'β	4.09 (dd, <i>J</i> =2.5, 12.30)	4.13 (d, <i>J</i> =11.96)		
<u>CH₃CO</u> -2'	2.00 (s)	2.03 (s)	20.70	20.66
<u>CH₃CO</u> -3'	2.1 (s)	2.04 (s)	21.0	20.74
<u>CH₃CO</u> -4'	2.1 (s)	2.07 (s)	21.0	20.78
<u>CH₃CO</u> -6'	2.2 (s)	2.10 (s)	20.63	20.63
<u>CH₃CO</u> -2'	-	-	170.10	169.42
<u>CH₃CO</u> -3'	-	-	170.20	170.38
<u>CH₃CO</u> -4'	-	-	170.10	169.32
<u>CH₃CO</u> -6'	-	-	170.20	170.73

Tabla 16. Comparación de datos espectroscópicos de **CIH-8Ac** con análogo reportado⁹⁶

Posición	RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz)	RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz)	RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz)	RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz)
	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
	Reportados ⁹⁶ J(Hz)	Obtenidos J(Hz)	Reportados	Obtenidos
1	1.00	1.09	37.03	37.20
	1.40			
2	1.28	1.27	29.46	29.46
	1.58			
3	3.48 (dd, J=5.16, 10.95)	3.50 (m)	81.6	80.10
4	2.21	2.21	39.0	38.93
	2.15			
5	-	-	140.5	140.37
6	5.33 (d, J=5.3)	5.38 (m)	122.2	122.18
7	1.60	1.62	31.10	31.95
	1.95			
8	1.43 (m)	1.45	31.8	31.87
9	0.88 (dd, J=3.03, 6.66)	1.04	50.26	50.17
10	-	-	37.0	36.73
11	1.48 (m)	1.48	20.8	21.05
	1.38 (m)			
12	2.03 (m)	1.98	39.98	39.75
	1.19 (m)			
13	-	-	42.6	42.33
14	0.97 (m)	1.06	57.0	56.76
15	1.24 (m)	1.24	24.4	24.30
	1.58 (m)			
16	1.12(m)	1.17	28.44	28.25
	1.20 (m)			
17	1.06 (m)	1.15	56.4	56.06
18	0.86 (s)	0.70 (s)	11.9	11.86
19	1.00 (s)	1.00 (s)	19.26	19.83
20	1.36 (m)	1.35	36.42	36.14
21	0.98 (d, J=6.5)	0.94 (d, J=6.64)	18.78	18.79
22	1.54	1.55	34.00	33.95
	1.38			
23	1.20	1.18	26.25	26.06
	0.72			
24	0.96	1.11	46.0	45.84
25	1.65	1.66	29.23	29.15
26	0.80 (d, J=6.5)	0.83 (d, J=8.04)	19.09	19.04
27	0.82 (d, J= 6.5)	0.85 (d, J=7.88)	20.80	19.37
28	1.30 m	1.30	23.10	23.08
29	0.86 (t, J=7.0)	0.86 (t, J=7.7)	12.20	11.99

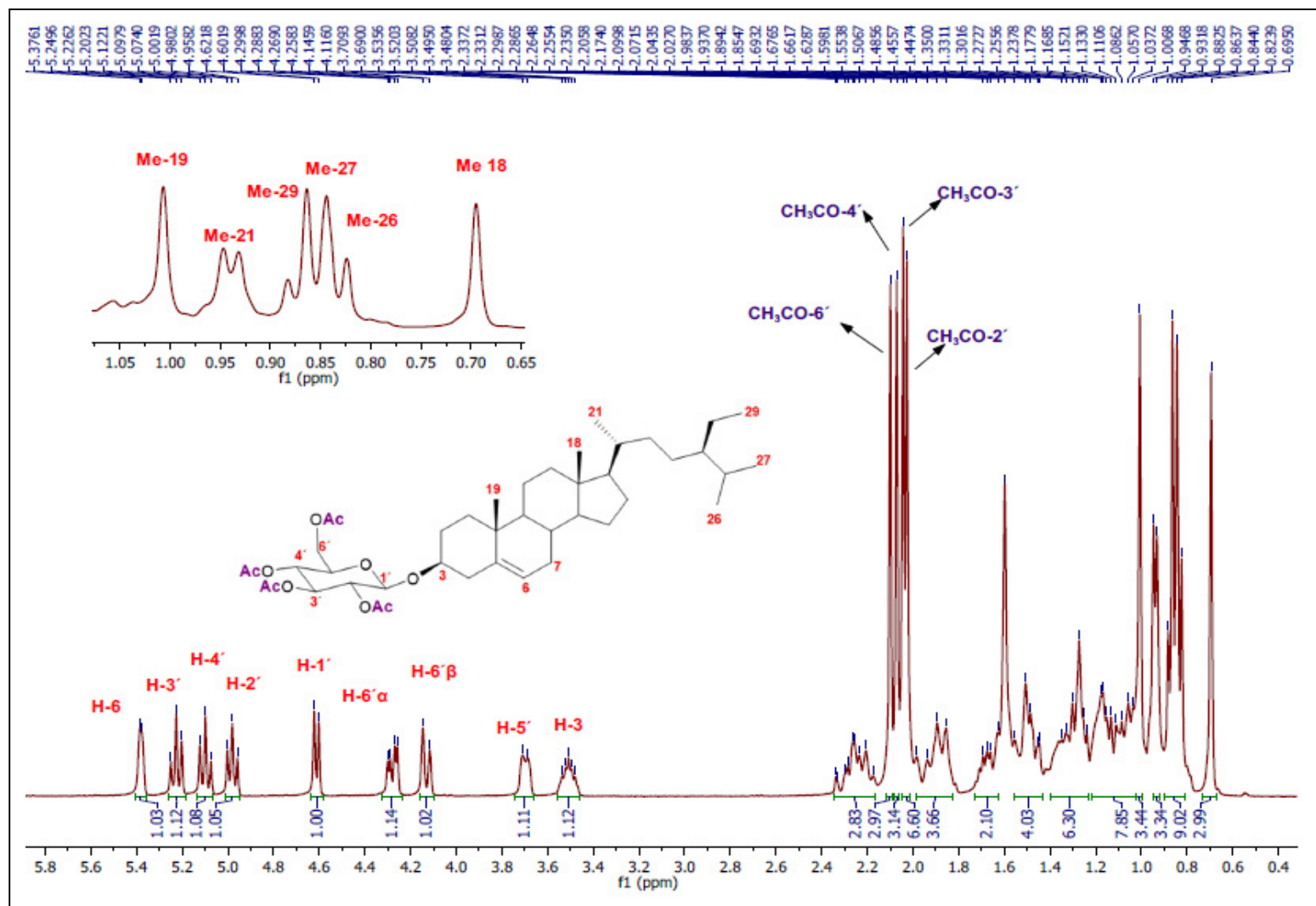


Figura 34. Espectro RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de β -D-tetraacetyl glucopiranósido de β -sitosterilo (CIH-8Ac)

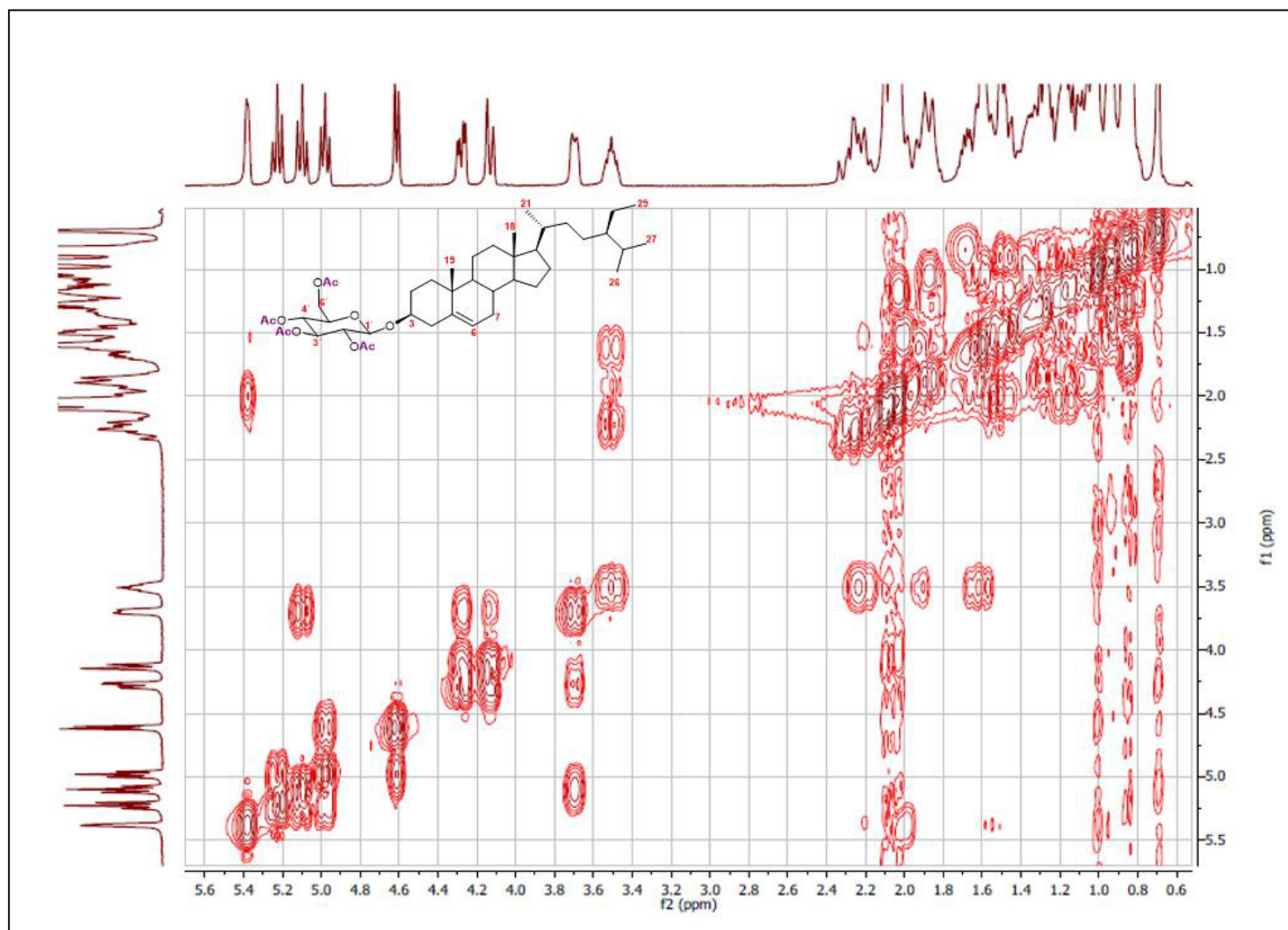


Figura 35. Espectro COSY de β -D-tetraacetyl glucopiranósido de β -sitosterilo (**CIH-8Ac**)

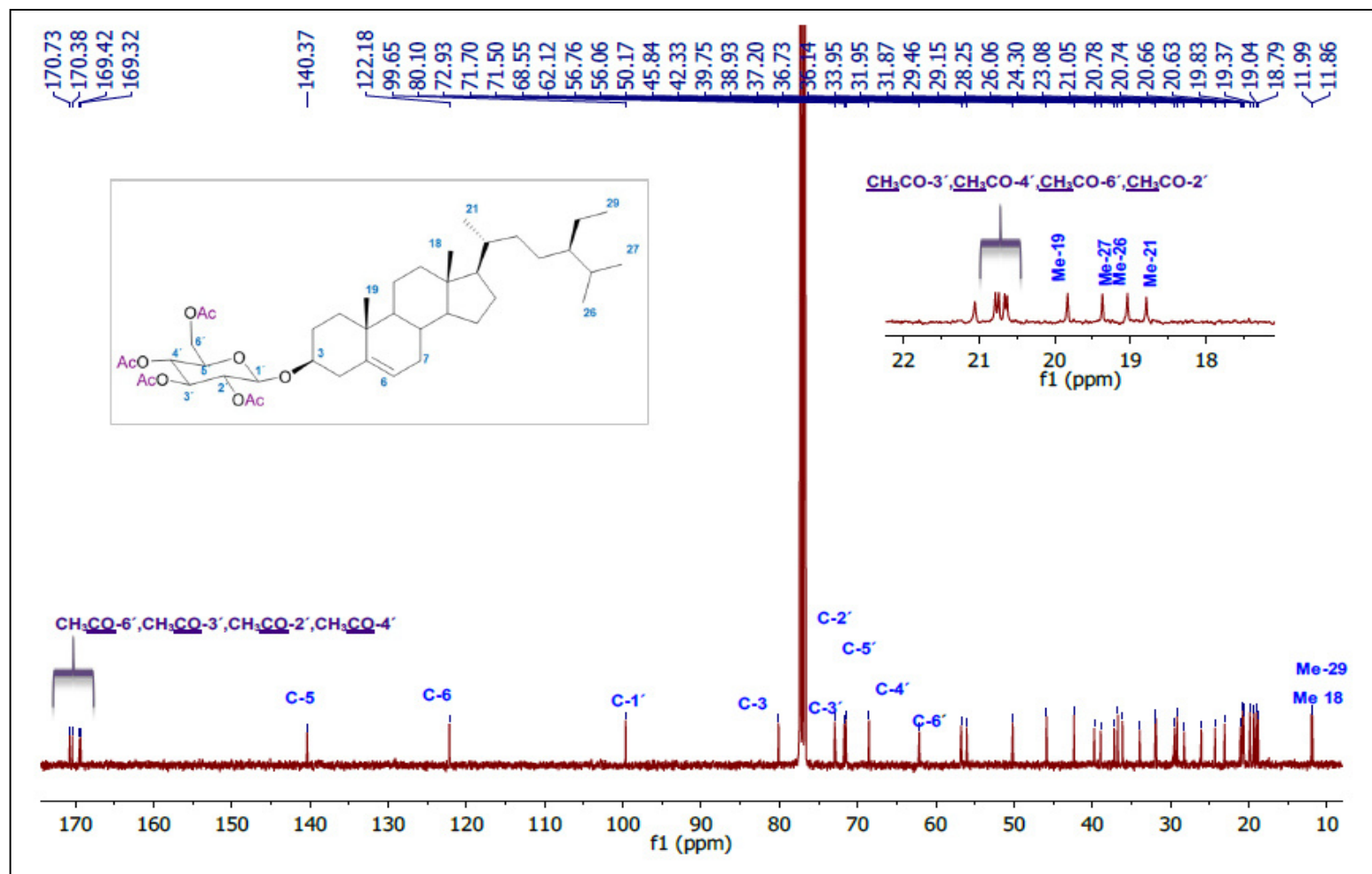


Figura 36. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de β -D-tetraacetil glucopiranosido de β -sitosterilo (CIH-8Ac)

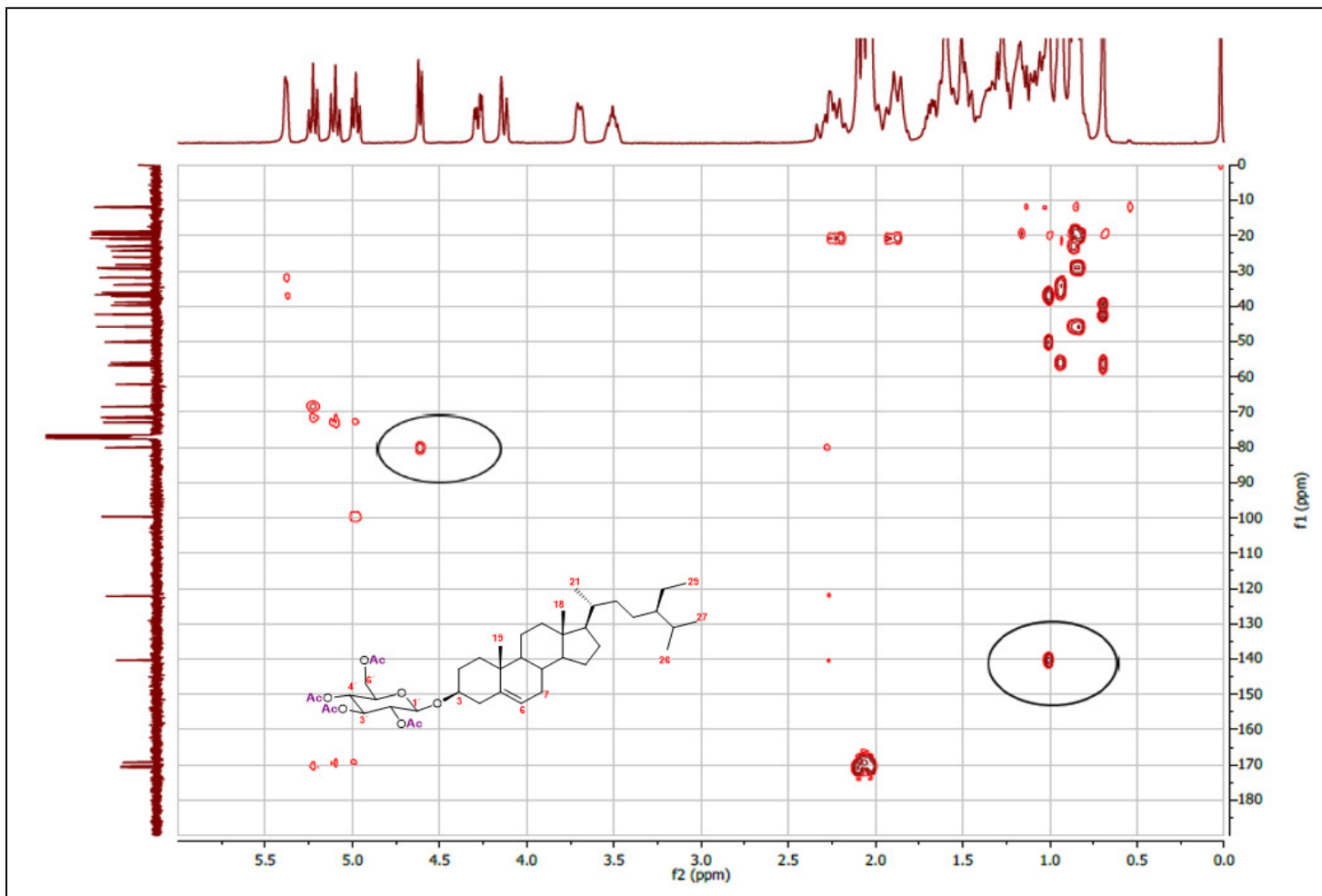


Figura 37. Espectro HMBC de β -D-tetraacetil glucopiranósido de β -sitosterilo (**CIH-8Ac**)

5.1.2.8 Propiedades físicas y espectroscópicas de CIH-5

Sólido blanco, soluble en CHCl_3 , pf: $150\text{-}154^\circ\text{C}$, IR (cm^{-1}): 3250, 2960, 2860, 1660, 1500, 1460, 1000, 750, 600. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.74-1.25 (CH_3), 1.5-2.41 (CH_2 , CH), 3.17-4.08 (CH-OH), 4.56-5.48 (CH=CH). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 14.59-31.10 (CH_3), 32.37-40.76 (CH_2 , CH), 41.54-59.0 ($-\text{CH}-$), 77.22-79.05 (C-O), 121.74-145.22 (C=C).

5.1.2.8.1 Elucidación estructural de la muestra CIH-5

El espectro IR de CIH-5 (Figura 38) mostró bandas a 3250 cm^{-1} indicando la presencia de grupos hidroxilo, y a 1660 cm^{-1} indicando la presencia de doble enlace. La gran complejidad de las señales observadas en los espectros de RMN ^1H y ^{13}C (Figuras 39 y 40), sugirieron una mezcla de terpenos. Ambos espectros, mostraron a campo alto un conglomerado de señales entre las que destacan por sus intensidades y multiplicidades aquellas correspondientes a metilos, así como metilenos y metinos (δ_{H} 0.74-1.25; δ_{C} 14-55), hidroximetinos (δ_{H} 3.0-4.0; δ_{C} 79), y protones olefinicos (δ_{H} 4.5-5.5; δ_{C} 121.74, 129.73 y 145.22). CIH-5 fue acetilada y luego caracterizada por CG-EM.

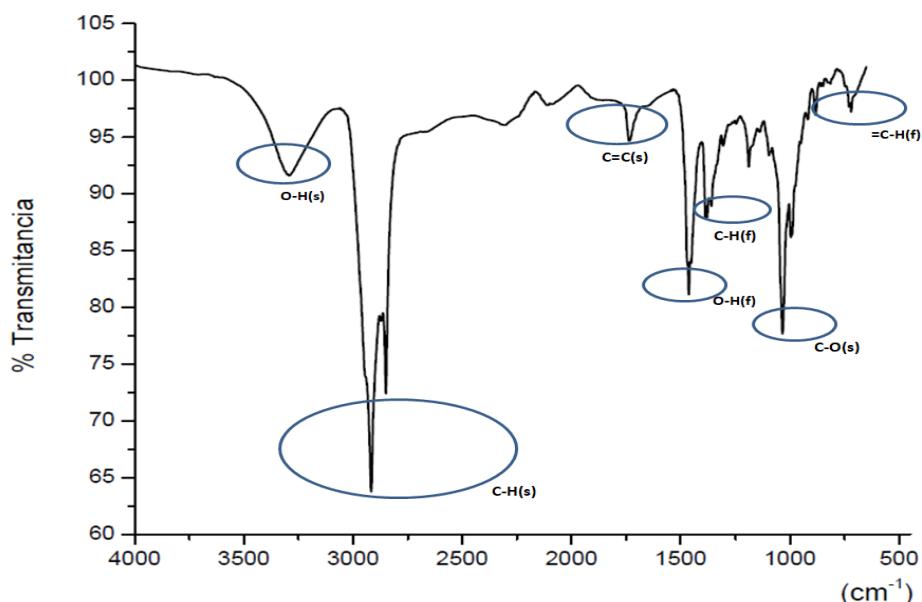


Figura 38. Espectro de IR de CIH-5

5.1.2.8.1.1 Análisis de la muestra CIH-5Ac por CG-EM

El cromatograma obtenido para el análisis de CIH-5Ac por CG-EM se muestra en la Figura 41. A su vez, en la Tabla 17 se indican las estructuras de compuestos acetilados que se identificaron (Figura 42). El compuesto más abundante fue el derivado acetilado de la α -amirina con un 34.98% de abundancia relativa. La α -amirina y el cicloursanol también fueron identificados en el extracto hexánico por CG-EM. Estos resultados confirman que las hojas de *C.incisa* son fuentes de triterpenoides, los cuales ya han sido identificados en otras especies dentro del género *Cissus*, tal y como lo demuestran los trabajos de Kuppuramalingam *et al.*⁹⁷ y Chan *et al.*⁹⁸

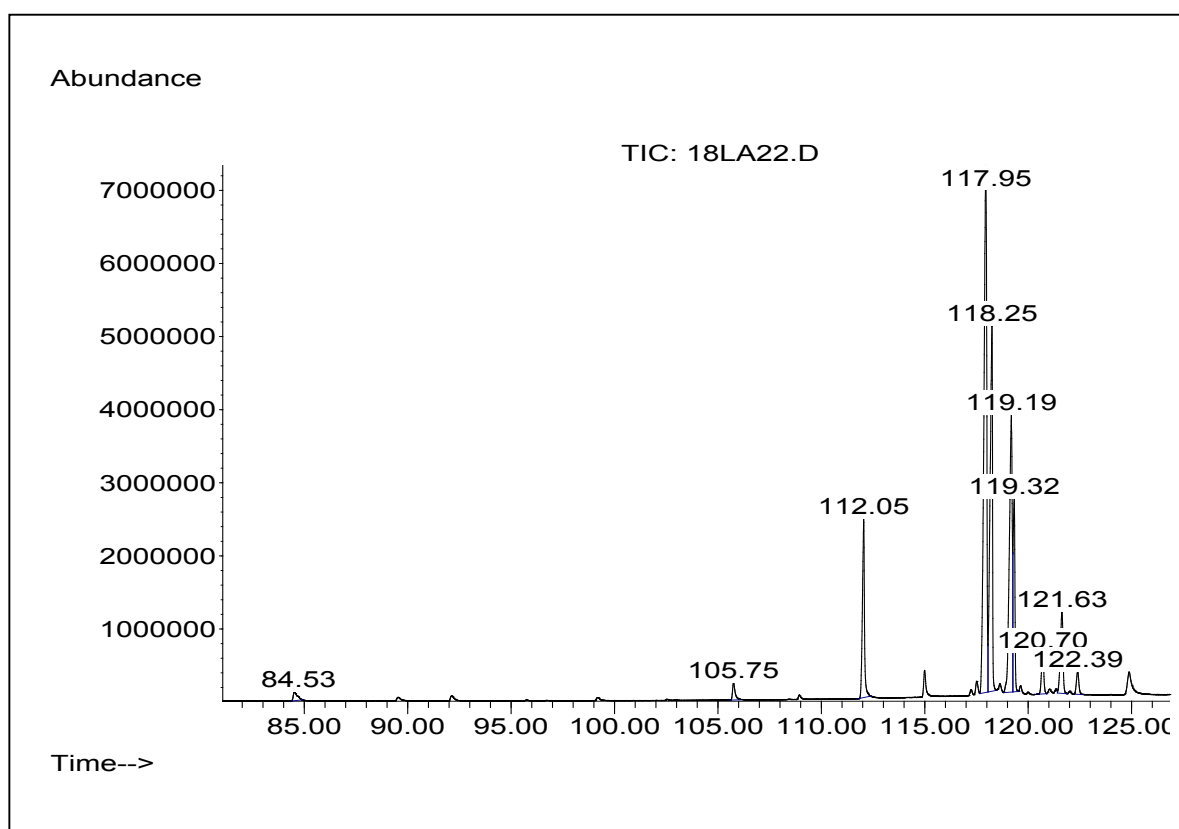


Figura 41. Cromatograma de Gases de **CIH-5Ac**

Tabla 17. Resultados de CG-EM de la muestra **CIH-5Ac**

Tiempo de retención (min)	% de Abundancia	Nombre del compuesto	Peso molecular (g/mol)	Fórmula molecular
117.951	34.98	acetato de (3β)-urs-12-en-3-il	468	C ₃₂ H ₅₂ O ₂
118.247	24.21	acetato de (3β)-Olean-18-en-3-il	468	C ₃₂ H ₅₂ O ₂
119.186	18.40	No identificado	-	
119.324	12.76	acetato de lupeol	468	C ₃₂ H ₅₂ O ₂
120.703	2.73	acetato de 13,27-cicloursan-3β-il	468	C ₃₂ H ₅₂ O ₂
121.636	5.44	acetato de (3β)-lanosta-8,24-dien-3-il	468	C ₃₂ H ₅₂ O ₂

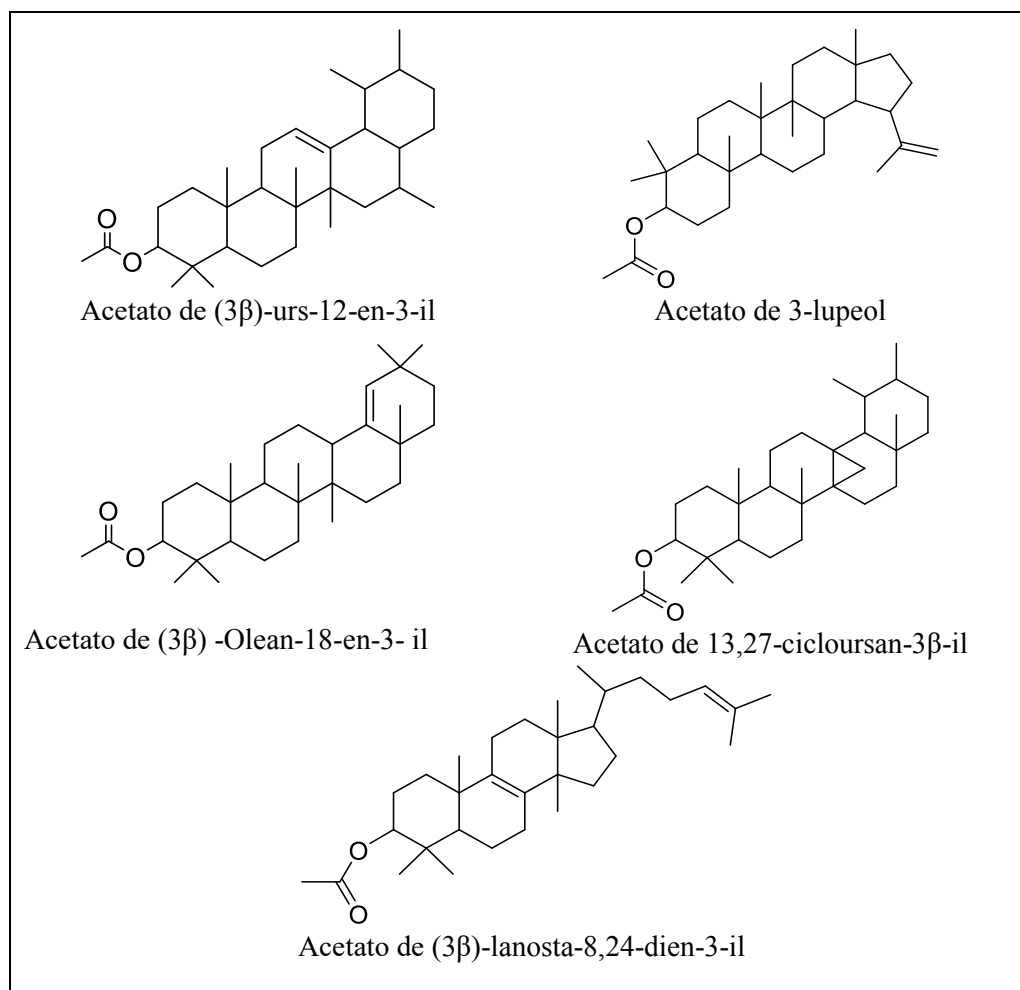


Figura 42. Terpenoides identificados en **CIH-5Ac**

5.1.2.9 Propiedades físicas y espectroscópicas de α -amirina-3-*O*-glucopiranosido

(CIH-11)

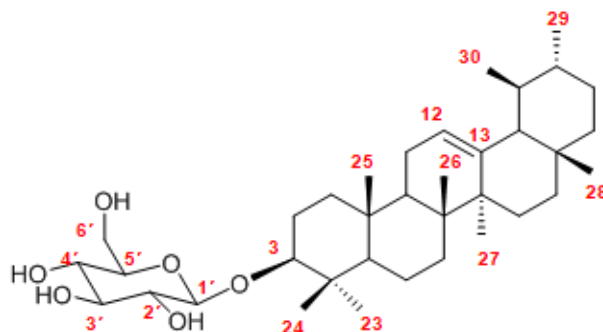


Figura 43. Estructura de 3-*O*- β -D-glucopiranosido de α -amirina (CIH-11)

3-*O*- β -D-glucopiranosido de α -amirina (estructura en Figura 43): sólido blanco amorfo, soluble en DMSO, C₃₆H₆₀O₆, PM_{calc.} 588.44 g/mol. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 0.66 (s, 3H, Me-25), 0.82 (s, 3H, Me-24), 0.82 (d, *J*=6.4 Hz, 6H, Me-29, 30), 0.91 (m, 3H, Me-26), 0.96 (s, 3H, Me-27), 1.23 (s, 6H, Me-23, 28), 2.90 (m, 1H, H-2'), 3.05 (m, 1H, H-4'), 3.10 (m, 1H, H-3'), 3.12 (m, 1H, H-5'), 3.42 (m, 1H, H-6' β), 3.45 (m, 1H, H-3), 3.64 (m, 1H, H-6' α), 4.22 (d, *J*=6.92 Hz, 1H, H-1'), 4.44 (s, 1H, OH-6'), 4.88 (sa, 3H, OH-2', 3', 4'), 5.33 (sa, 1H, H-12). RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 12.14 (C25), 12.26 (C24), 19.09 (C26), 19.40 (C29), 19.58 (C27), 20.19 (C30), 21.08 (C6), 23.07 (C28), 24.35 (C11), 25.88 (C16), 28.28 (C15), 29.16 (C23), 29.51 (C2), 29.74 (C7), 31.85 (C21), 31.89 (C17), 33.81 (C10), 35.97 (C4), 36.68 (C1), 37.31 (C19), 38.77 (C20), 42.33 (C8 y C22), 45.61 (C14), 50.07 (C9), 55.90 (C5), 56.65 (C18), 61.55 (C6'), 70.54 (C4'), 73.93 (C2'), 77.23 (C3' y C5'), 77.38 (C3), 101.26 (C1'), 121.69 (C12), 140.91 (C13).

5.1.2.9.1 Elucidación estructural de 3-O- β -D-glucopiranosido de α -amirina

(CIH-11)

El compuesto con clave CIH-11 es el glucósido de la α -amirina, un triterpeno bien conocido y previamente caracterizado por otros investigadores.⁹⁹ El espectro de RMN ^1H de CIH-11 (Figura 44), presenta señales características a su aglicona. Se observó a campo alto un conglomerado de señales entre las que se destacan por su intensidad, las que integran para 24 protones pertenecientes a los 8 metilos, δ : 0.66 (Me-25), 0.82 (Me-24, 29 y 30), 0.91 (Me-26), 0.96 (Me-27), 1.23 (Me-23 y 28). En la región δ 2.89-3.45 encontramos multipletes que integran para cinco hidroximetinos δ : 2.90 (H-2'), 3.05 (H-4'), 3.10 (H-3'), 3.12 (H-5'), 3.45 (H-3), así como otros multipletes correspondientes a dos hidroximetilenos δ : 3.42 (H-6' β), 3.65 (H-6' α). El protón anomérico (H-1') de la β -D-glucosa, se aprecia en δ 4.22 (d, J = 6.92 Hz), corroborando que la unión es β . A campos más bajos podemos encontrar las señales de los protones de los grupos hidroxilo de la glucosa δ : 4.44 (OH-6'), 4.88 (OH- 2', 3', 4'). En el espectro de COSY (Figura 45) se observaron las correlaciones de los hidrógenos de la glucosa: 3'/4' (δ_{H} 3.10/ δ_{H} 3.05), 1'/2' (δ_{H} 4.22/ δ_{H} 2.90), 4'/5' (δ_{H} 3.05/ δ_{H} 3.12), 5'/6' α (δ_{H} 3.12/ δ_{H} 3.65), 5'/6' β (δ_{H} 3.12/ δ_{H} 3.42). A través de los datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C (Figura 46) se confirma la presencia de la glucosa: δ (ppm) 61.54 (C6'), 70.54 (C4'), 73.93 (C2'), 77.23 (C3'y C5'), 101.26 (C1'). El experimento HSQC (Figura 47) fue útil para relacionar los protones con sus correspondientes carbonos, pero de forma esencial para establecer cuáles señales eran de -OH. Por su parte, en el espectro HMBC (Figura 48) se observaron correlaciones importantes entre H-1' (δ 4.22) con C-3 (δ 77.38) (protón anomérico con el C-3 de la aglicona) indicando la unión del azúcar a la aglicona. Por último en δ 5.33 se observó un singulete ancho integrando para el protón de la doble ligadura entre el carbono C-12 y C-

13 (δ 121.69 y δ 140.91) de la aglicona. La ubicación de la doble ligadura en la aglicona se corroboró por la correlación que se observó en el espectro HMBC entre Me-27 y C-13. Los datos espectroscópicos obtenidos para este compuesto fueron comparados con los reportados por Kang *et al.*⁹⁹, los resultados se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. Comparación de datos espectroscópicos de **CIH-11** con 3-*O*- β -D-glucopiranosido de α -amirina aislado de *Dryopteris wallichiana*

Posición	Referencia ⁹⁹		Datos Obtenidos	
	RMN ¹ H (DMSO, 400 MHz)	RMN ¹³ C (DMSO, 100 MHz)	RMN ¹ H (DMSO, 400 MHz)	RMN ¹³ C (DMSO, 100 MHz)
1'	4.21 (1H, d, $J = 7.7$ Hz)	101.3	4.22 (d, 1H, $J = 6.92$ Hz)	101.56
2'		74.8	2.90 m	73.93
3'		76.4	3.10 m	77.23
4'		70.3	3.05 m	70.54
5'		76.5	3.12 m	77.23
6'		61.5	3.65 (m, 1H, 6' α) 3.42 (m, 1H, 6' β)	61.55

Tabla 18. Comparación de datos espectroscópicos de **CIH-11** con 3-*O*-β-D-glucopiranosido de α-amirina aislado de *Dryopteris wallichiana*. (Continuación)

Posición	Referencia ⁹⁹		Datos obtenidos	
	RMN ¹ H (DMSO, 400 MHz)	RMN ¹³ C (DMSO, 100 MHz)	RMN ¹ H (DMSO, 400 MHz)	RMN ¹³ C (DMSO, 100 MHz)
1		38.8		36.68
2		28.3		29.51
3		77.5		77.38
4		37.3		35.97
5		55.9		55.90
6		19.1		21.08
7		31.9		29.74
8		40.0		42.33
9		45.6		50.17
10		35.9		33.81
11		24.3		24.35
12	5.35 (sa, 1H)	121.7	5.33 (sa, 1H)	121.69
13		140.9		140.91
14		42.3		45.61
15		28.3		28.28
16		26.0		25.88
17		33.8		31.89
18		56.7		56.65
19		39.6		37.31
20		39.7		38.77
21		31.9		31.85
22		42.3		42.33
23	0.78 (s, 3H)	28.3	1.23 (s, 3H)	29.16
24	0.80 (s, 3H)	12.3	0.82 (s, 3H)	12.26
25	0.82 (s, 3H)	12.1	0.66 (s, 3H)	12.14
26	0.95 (s, 3H)	19.1	0.91 (s, 3H)	19.09
27	0.80 (s, 3H)	20.2	0.96 (s, 3H)	19.58
28	0.65 (s, 3H)	26.0	1.23 (s, 3H)	23.07
29	0.89 (d, <i>J</i> =6.4 Hz, 3H)	19.4	0.82 (d, <i>J</i> =6.4 Hz, 3H)	19.40
30	0.82 (3H, d, <i>J</i> =6.4 Hz)	20.2	0.82 (3H, d, <i>J</i> =6.4 Hz)	20.19

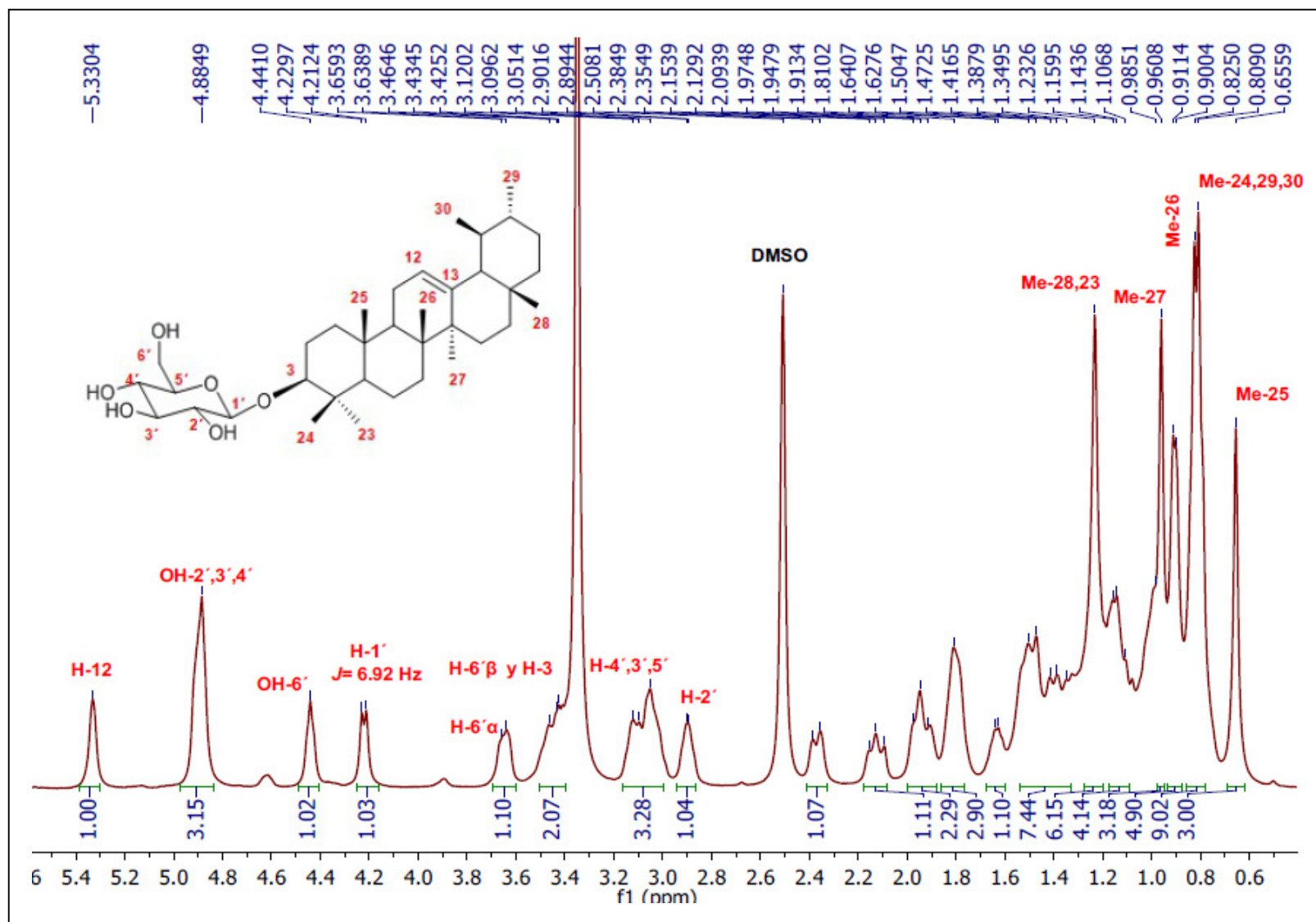


Figura 44. Espectro RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) de 3-O-β-D-glucopiranósido de α-amirina (**CIH-11**)

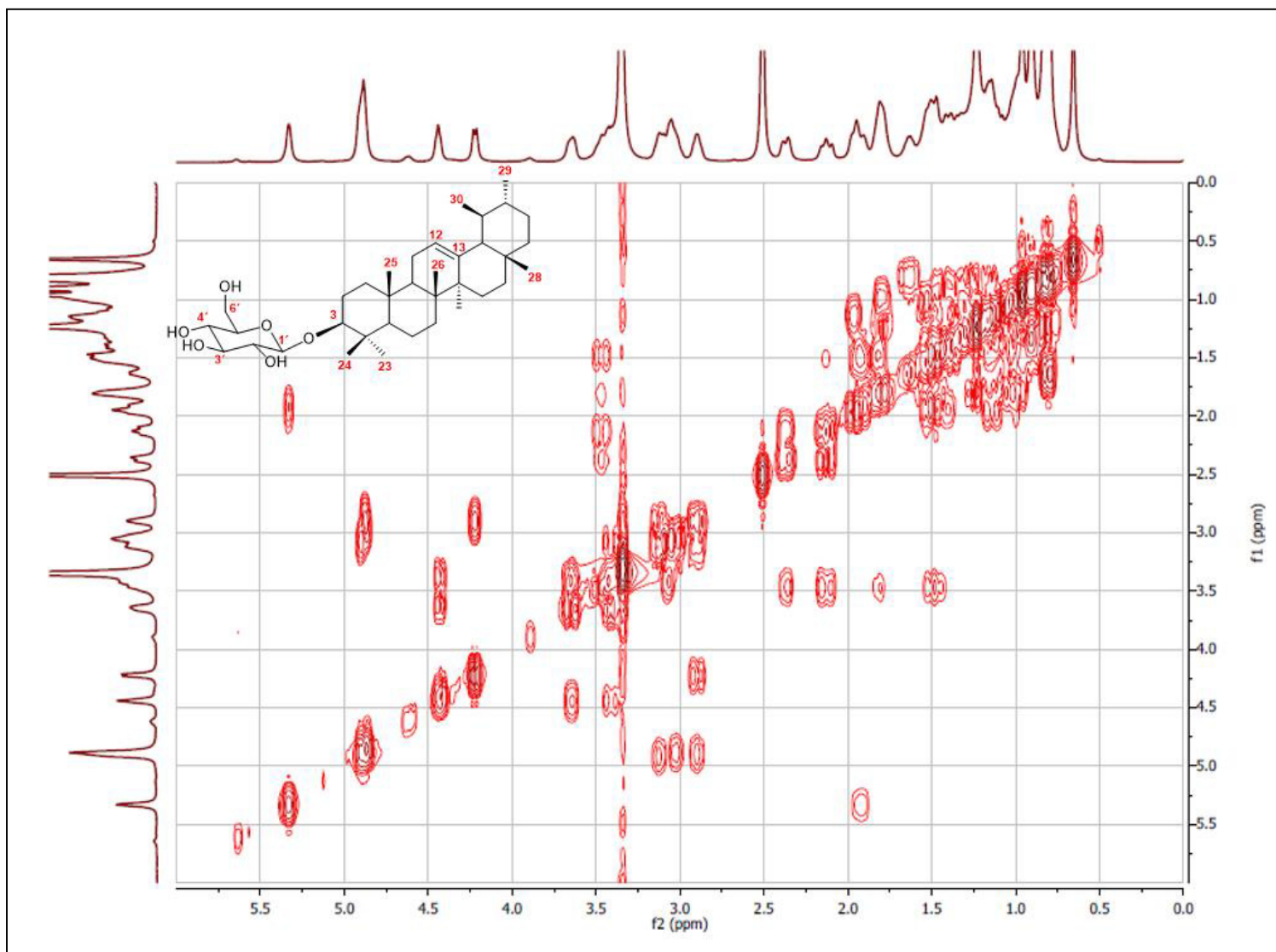


Figura 45. Espectro COSY de 3-*O*- β -D-glucopiranosido de α -amirina (CIH-11)

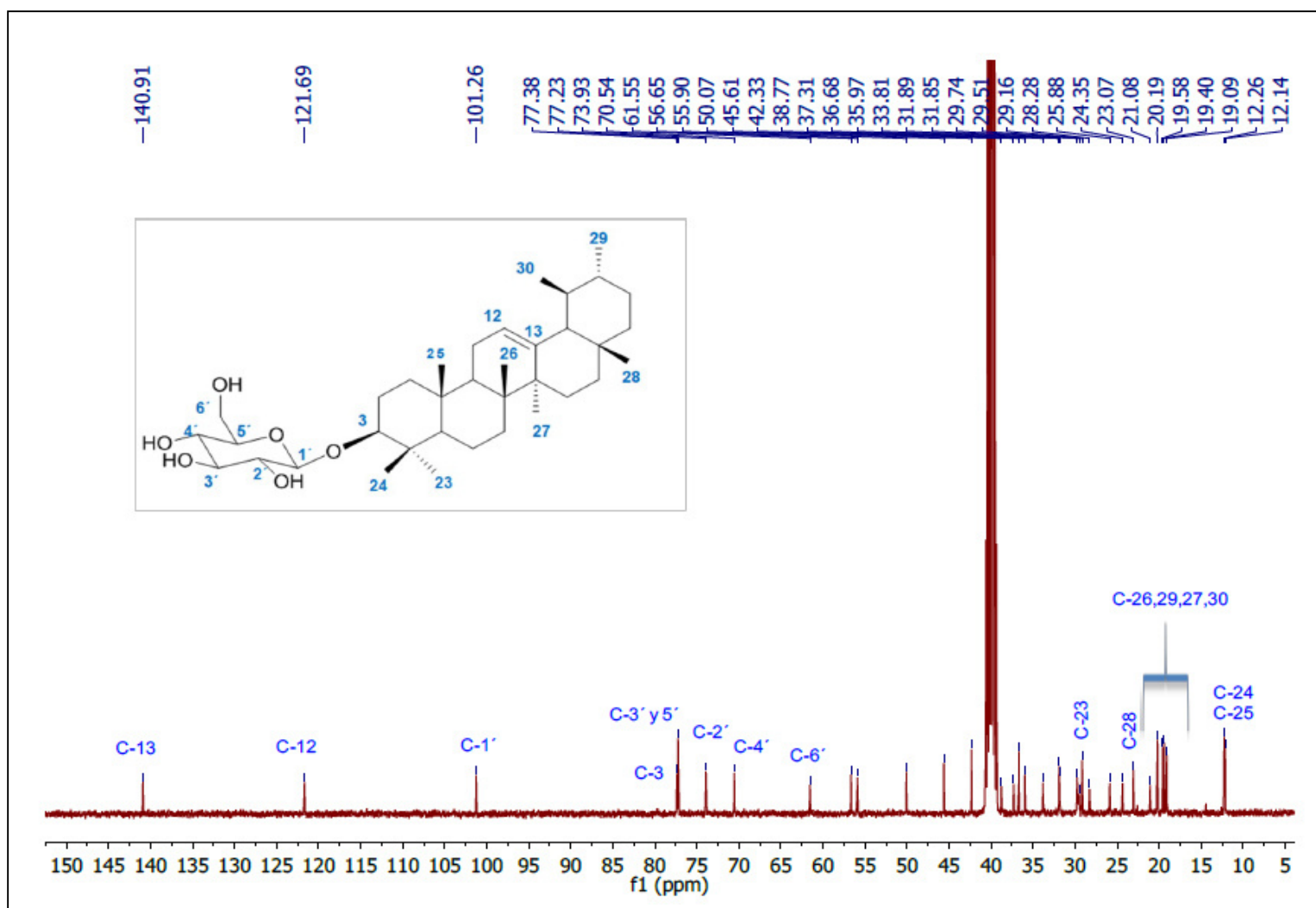


Figura 46. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) de 3-O- β -D-glucopiranosido de α -amirina (CIH-11)

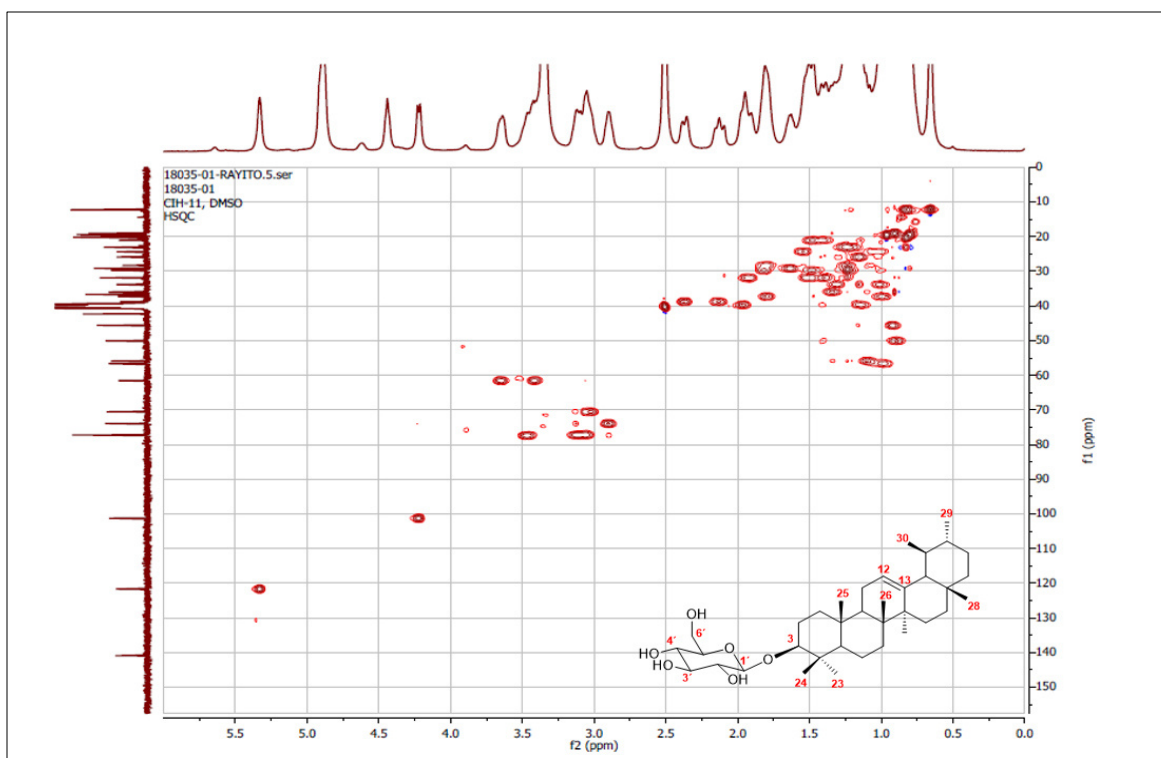


Figura 47. Espectro HSQC de 3-O-β-D-glucopiranosido de α-amirina (CIH-11)

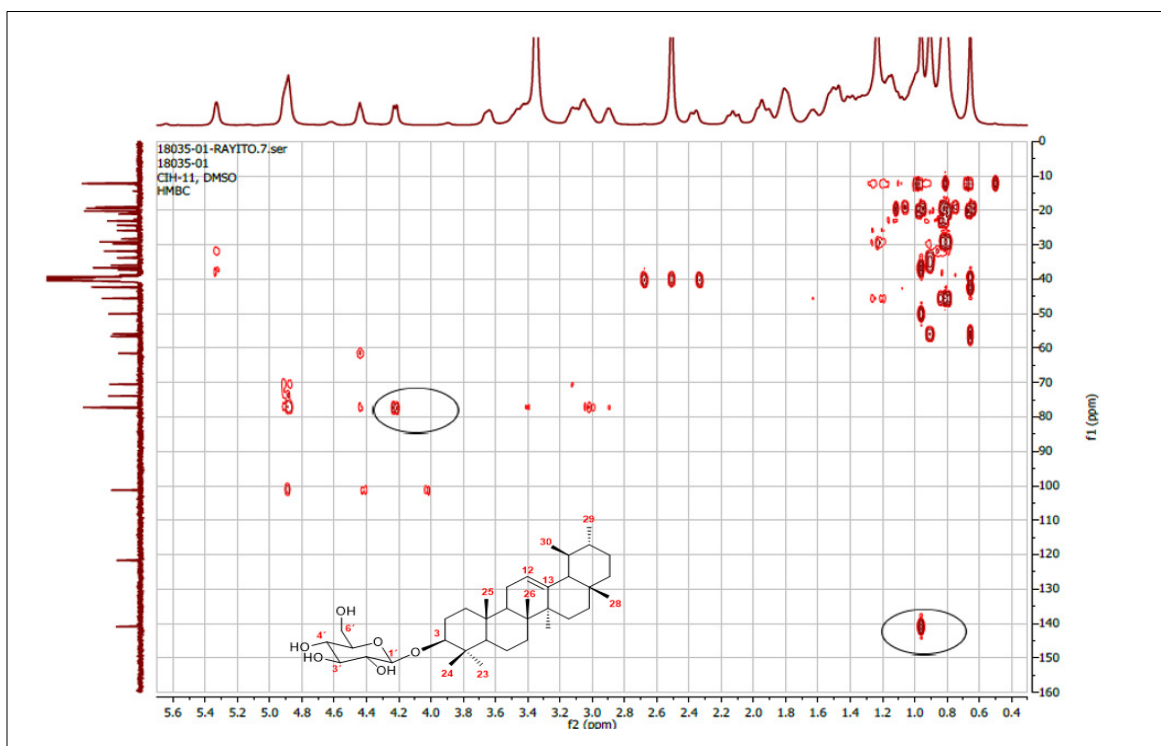


Figura 48. Espectro HMBC de 3-O-β-D-glucopiranosido de α-amirina (CIH-11)

5.1.2.10 Propiedades físicas y espectroscópicas de tetraacetil 3-O-β-D-glucopiranosido de α-amirina (CIH-11Ac)

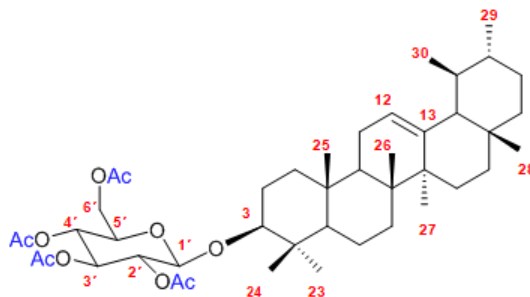


Figura 49. Estructura de tetraacetil 3-O-β-D-glucopiranosido de α-amirina (CIH-11Ac)

Tetraacetil 3-O-β-D-glucopiranosido de α-amirina (Figura 49): sólido cristalino, soluble en CHCl₃, C₄₄H₆₈O₁₀, PM_{calc.} 756.48 g/mol. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.61 (s, 3H, Me-25), 0.74 (d, *J*=5.44Hz, 3H, Me-29), 0.76 (s, 3H, Me-24), 0.77 (s, 3H, Me-26), 0.78 (s, 3H, Me-23), 0.85 (d, *J*=5.12Hz, 3H, Me-30), 0.91 (s, 6H, Me-27, Me-28), 1.93 (s, 3H, CH₃CO-2'), 1.95 (s, 3H, CH₃CO-3'), 1.98 (s, 3H, CH₃CO-4'), 2.01 (s, 3H, CH₃CO-6'), 3.42 (m, 1H, H-3), 3.60 (m, 1H, H-5'), 4.04 (dd, *J*=9.78Hz, 1.96Hz, 1H, H-6'β), 4.19 (dd, *J*=9.76Hz, 3.90Hz, 1H, H-6'α), 4.52 (d, *J*=6.36 Hz, 1H, H-1'), 4.89 (dd, *J*=7.72Hz, 6.4Hz, 1H, H-2'), 5.01 (t, *J*=7.76Hz, 1H, H-4'), 5.13 (t, *J*=7.62Hz, 1H, H-3'), 5.29 (m, 1H, H-12). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 11.86 (C25), 11.99 (C24), 18.79 (C26), 19.04 (C29), 19.36 (C27), 19.82 (C30), 20.62 (CH₃CO-2'), 20.65 (CH₃CO-3'), 20.73 (CH₃CO-4'), 20.77 (CH₃CO-6'), 21.06 (C6), 23.08 (C28), 24.30 (C11), 26.08 (C16), 28.24 (C15), 29.17 (C23), 29.46 (C2), 29.72 (C7), 31.23 (C21), 31.88 (C17), 33.96 (C10), 36.14 (C4), 36.73 (C1), 37.21(C19), 38.93 (C20), 39.75 (C8), 42.34 (C22), 45.85 (C14), 50.18 (C9), 56.07 (C5), 56.77 (C18), 62.13 (C6'), 68.57 (C4'), 71.52 (C2'), 71.71 (C3'), 72.94 (C5'), 80.09 (C3), 99.66 (C1'), 122.18 (C12), 140.38 (C13), 169.31 (CH₃CO-4'), 169.41 (CH₃CO-2'), 170.37 (CH₃CO-3'), 170.71 (CH₃CO-6').

5.1.2.10.1 Elucidación estructural de tetraacetil 3-*O*- β -D-glucopiranosido de α -amirina (CIH-11Ac)

El espectro de RMN ^1H (Figura 50) de **CIH-11Ac** es similar al de su producto natural. A campo alto observamos el conglomerado de señales típicas para los ocho metilos. Las cuales integran para 24 protones, δ : 0.61 (Me-25), 0.74 (Me-29), 0.76 (Me-24), 0.77 (Me-26), 0.78 (Me-27), 0.85 (Me-30), 0.91 (Me-28 y Me-23). Como nuevas señales encontramos a campo alto los singuletes correspondientes a los grupos acetilo δ : 1.93 ($\text{CH}_3\text{CO}-2'$), 1.95 ($\text{CH}_3\text{CO}-3'$), 1.98 ($\text{CH}_3\text{CO}-4'$) y 2.01 ($\text{CH}_3\text{CO}-6'$). Los hidrógenos de carbonos unidos a los grupos éster quedaron ubicados entre δ 3.38 y 5.13 ppm para los hidrógenos: H-3, 5', 6' β , 6' α , 2', 4' y 3', mientras que el protón anomérico H-1' se ubicó en δ 4.52 (d, $J=6.36$ Hz), confirmando la orientación β de la glucosa por el acoplamiento axial-axial con el protón H-2'. En el espectro de COSY (Figura 51) se observaron las correlaciones de los hidrógenos de la glucosa: 3'/4' (δ_{H} 5.13/ δ_{H} 5.01), 1'/2' (δ_{H} 4.52/ δ_{H} 4.89), 4'/5' (δ_{H} 5.01/ δ_{H} 3.60), 5'/6' α (δ_{H} 3.60/ δ_{H} 4.19), 5'/6' β (δ_{H} 3.60/ δ_{H} 4.04). La acetilación del producto natural quedó confirmada con el espectro de RMN ^{13}C (Figura 52), al observar las señales de los cuatro metilos unidos al grupo carbonilo de los ésteres en δ : 20.62 ($\text{CH}_3\text{CO}-2'$), 20.65 ($\text{CH}_3\text{CO}-3'$), 20.73 ($\text{CH}_3\text{CO}-4'$), 20.77 ($\text{CH}_3\text{CO}-6'$), y de los cuatro carbonilos correspondientes en δ (ppm): 169.31 ($\text{CH}_3\text{CO}-4'$), 169.41 ($\text{CH}_3\text{CO}-2'$), 170.37 ($\text{CH}_3\text{CO}-3'$) y 170.71 ($\text{CH}_3\text{CO}-6'$). El espectro de HSQC (Figura 53) mostró correlaciones entre los carbonos y los hidrógenos de la glucosa. En el espectro de HMBC, correspondiente a la Figura 54, se observó la correlación entre H-1' y el C3, indicando la unión del azúcar a la aglicona, igualmente se observó la correlación entre el Me-27 y el C-13 confirmando la ubicación de la doble ligadura en la aglicona (ambas correlaciones se indican en el espectro).

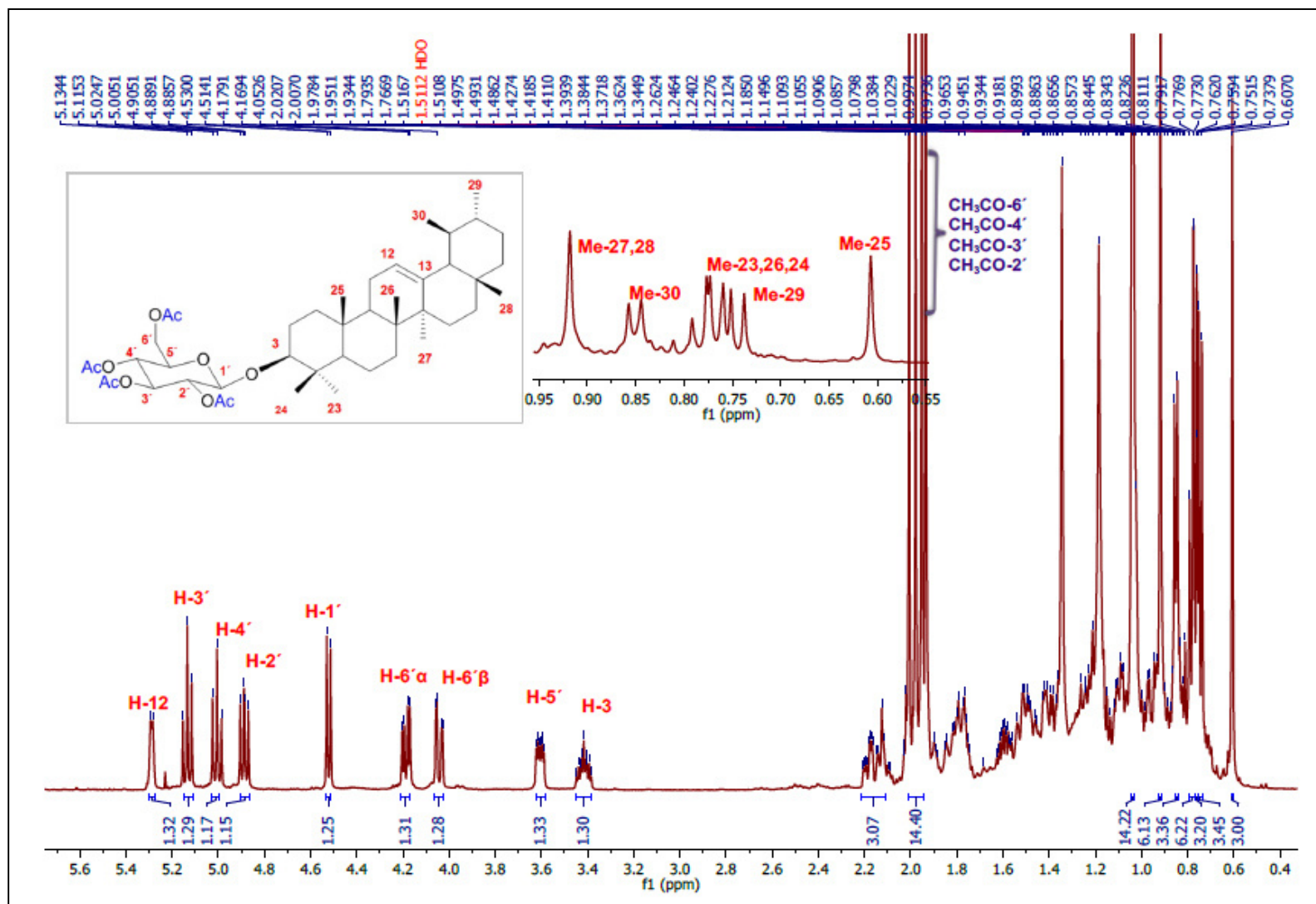


Figura 50. Espectro RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de tetraacetil 3-O- β -D-glucopiranosido de α -amirina (CIH-11Ac)

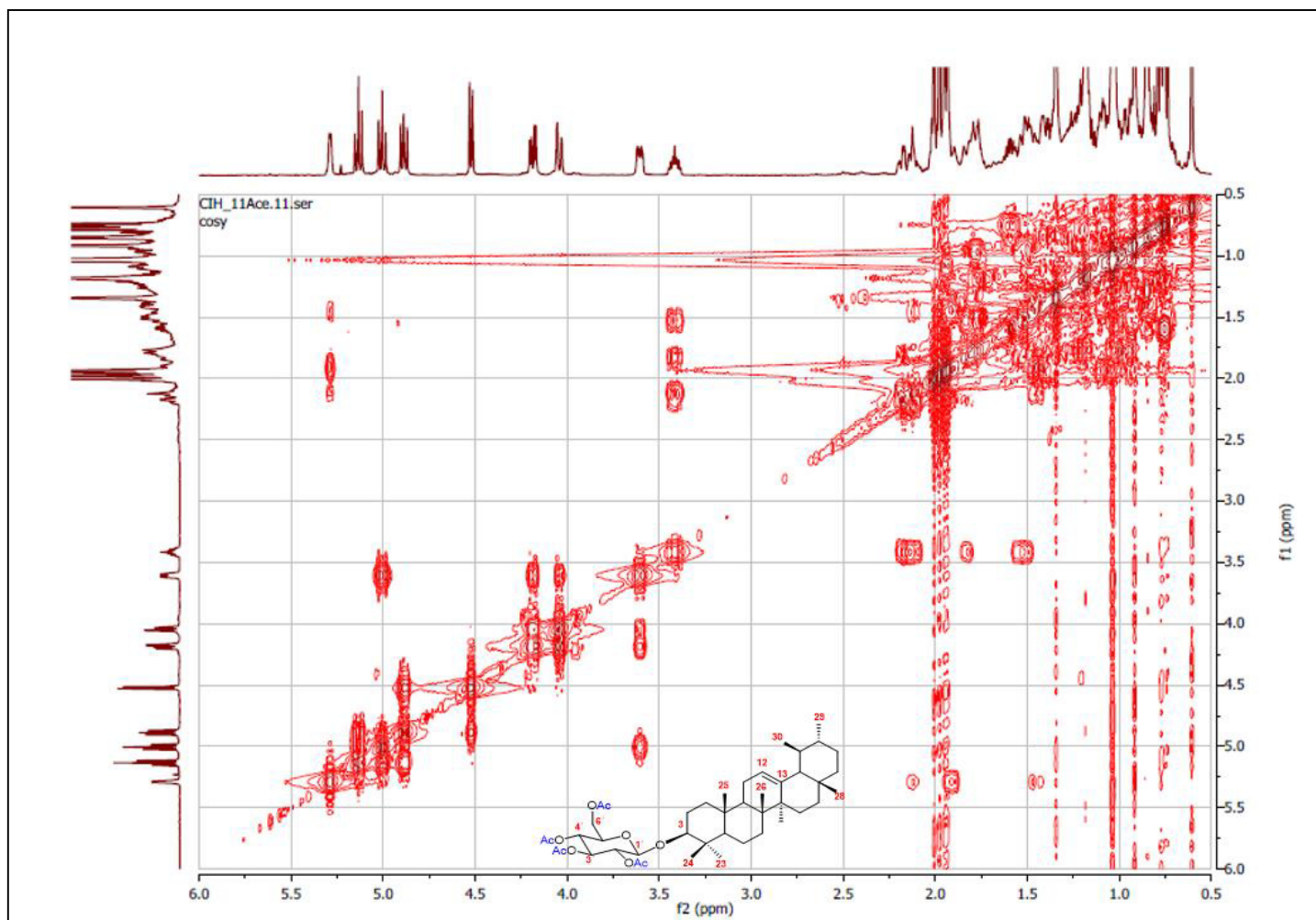


Figura 51. Espectro COSY de tetraacetil 3-*O*- β -D-glucopiranosido de α -amirina (CIH-11Ac)

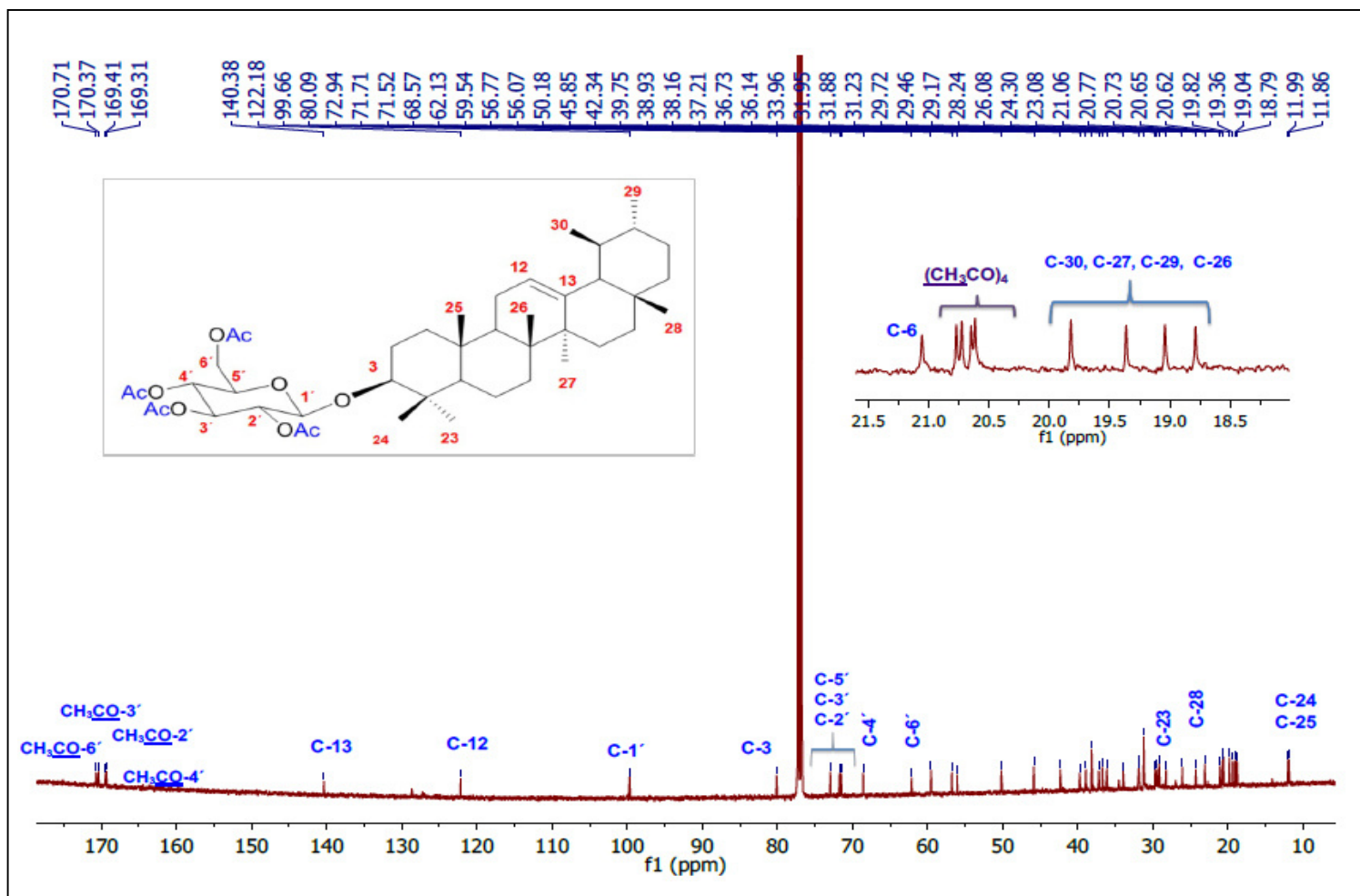


Figura 52. Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) de tetraacetil 3-O-β-D-glucopiranosido de α-amirina (CIH-11Ac)

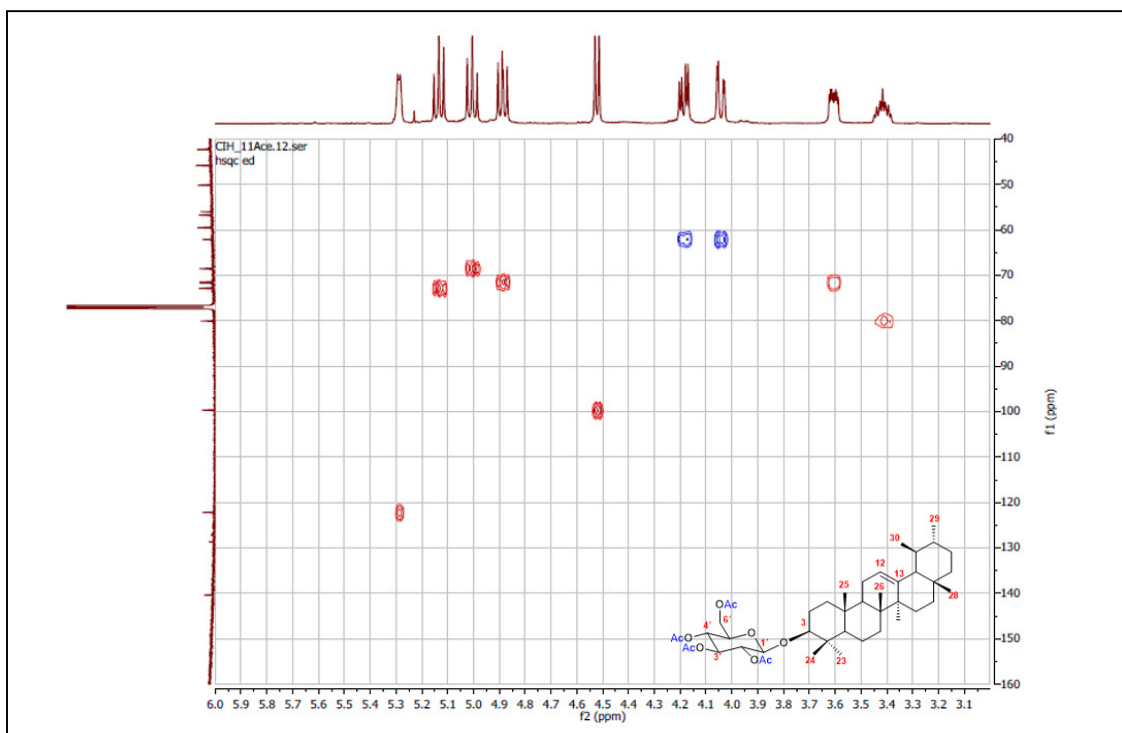


Figura 53. Espectro HSQC (expansión) de tetraacetil 3-*O*- β -D-glucopiranosido de α -amirina (CIH-11Ac)

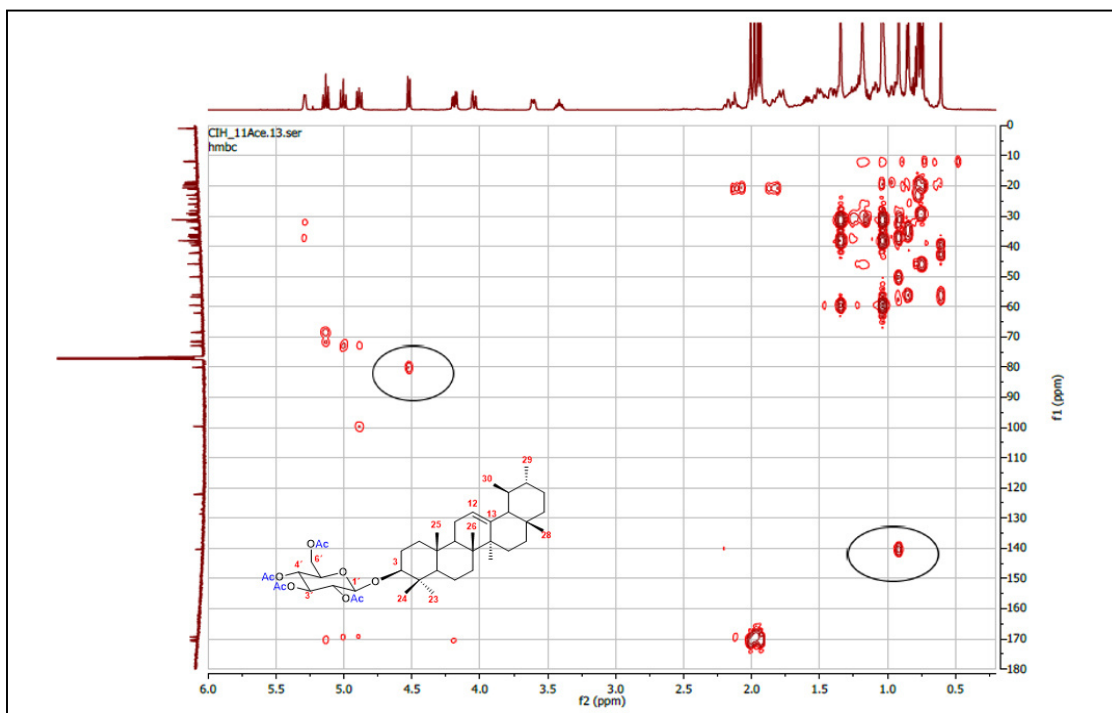


Figura 54. Espectro HMBC de tetraacetil 3-*O*- β -D-glucopiranosido de α -amirina (CIH-11Ac)

5.1.2.11 Propiedades físicas y espectroscópicas de las ceramidas CIH-13

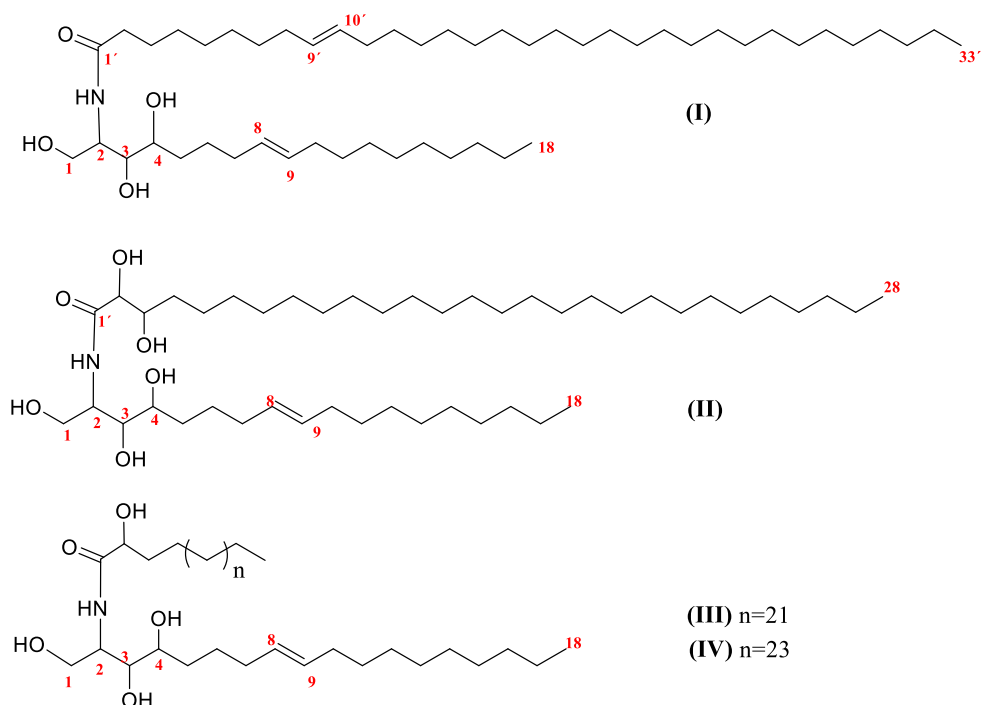


Figura 55. Estructuras de los compuestos identificados en las ceramidas **CIH-13**

Sólido amorfo de color amarillo-verdoso, soluble en DMSO, pf 139-141°C. HRMS-ESI (modo de ionización positiva) m/z : 790 $[M+H]^+$, 753 $[M]^+$, 723 $[M]^+$, y 751 $[M]^+$. UPLC-QToF-MS m/z : 789.5898 $[M]^+$ ($C_{51}H_{99}NO_4$, calc. 789.7574); 753.5657 $[M]^+$ ($C_{46}H_{91}NO_6$, calc. 753.6846); 723.6073 $[M]^+$ ($C_{45}H_{89}NO_5$, calc. 723.6741); 751.6426 $[M]^+$ ($C_{47}H_{93}NO_5$, calc. 751.7054, (estructuras mostradas en Figura 55). RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3/MeOD$ 80:20) δ (ppm): 0.88 (m, Me), 1.27 (sa, CH_2), 1.42 (m, H-5), 1.58 (m, H-3' β), 1.69 (m, H-10), 1.78 (m, H-3' α), 1.98 (m, H-7), 3.54 (m, H-3, H-4), 3.78 (m, H-1), 4.04 (m, H-2', OH), 4.12 (m, H-2), 5.41 (m, H-8, H-9), 7.59 (d, $J=6.32$ Hz, NH). RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3/MeOD$ 80:20) δ (ppm): 14.21 (Me), 22.96 (CH_2), 25.49 (CH_2), 26.12 (CH_2), 26.14

(CH₂), 26.18 (CH₂), 26.19 (CH₂), 26.21 (CH₂), 29.53 (CH₂), 29.65 (CH₂), 29.83 (CH₂), 29.85 (CH₂), 29.90 (CH₂), 29.98 (CH₂), 30.01 (CH₂), 32.23 (CH₂), 32.92 (C7, C5), 33.07 (C10), 34.78 (C3'), 51.94 (C2), 61.35 (C1), 72.26 (C4), 72.62 (C2'), 75.71 (C3), 130.21 (C9), 131.01 (C8), 176.22 (C1').

5.1.2.11.1 Elucidación estructural de CIH-13

Los espectros de RMN ¹H (Figura 56) y RMN ¹³C (Figura 58) mostraron patrones de señales que sugerían la presencia de una ceramida. La ceramida constituye la columna vertebral hidrófoba de todos los esfingolípidos complejos, y estructuralmente consiste en una base de cadena larga (LCB, *por sus siglas en inglés*) unida en un enlace amida a un ácido graso con cadena de longitud variable. Dependiendo de la fuente, esta estructura básica de ceramida puede modificarse por diferencias en la longitud de las cadenas, ramificación de metilo, inserción de grupos hidroxilo adicionales y grado de insaturación. La mayoría de las LCB de plantas tienen dieciocho carbonos, aunque también se han reportado pequeñas cantidades de otras longitudes de cadena, mientras que el ácido graso de cadena muy larga (VLCFA, *por sus siglas en inglés*) también puede sufrir modificaciones, lo que conduce a una multiplicidad de isoformas de esfingolípidos en plantas.¹⁰⁰

En nuestro caso particular, se dedujo un grupo amida secundario al analizar los espectros de RMN ¹H y RMN ¹³C por las siguientes señales: protón unido a nitrógeno a δ_H 7.59 (d, $J=6.32$ Hz), carbono unido a nitrógeno en δ_C 51.94 y carbono carbonílico en δ_C 176.22. En RMN ¹H, la señal de metilos terminales a δ 0.88 y las fuertes señales a δ 1.27 propia de cadenas alifáticas también confirmaron la ceramida. Correlaciones importantes se obtuvieron del espectro COSY (Figura 57), la señal a δ_H 4.12 correspondiente a H-2, se correlacionó con las señales a δ_H 3.78 (H-1), y δ_H 3.54 (H-3). Los carbonos C1, C3, C4 y

C2' fueron asignados a las señales en δ_C : 61.35, 75.74, 72.26 y 72.62, respectivamente, sobre la base del espectro HSQC (Figura 59), demostrando que estas posiciones estaban hidroxiladas.

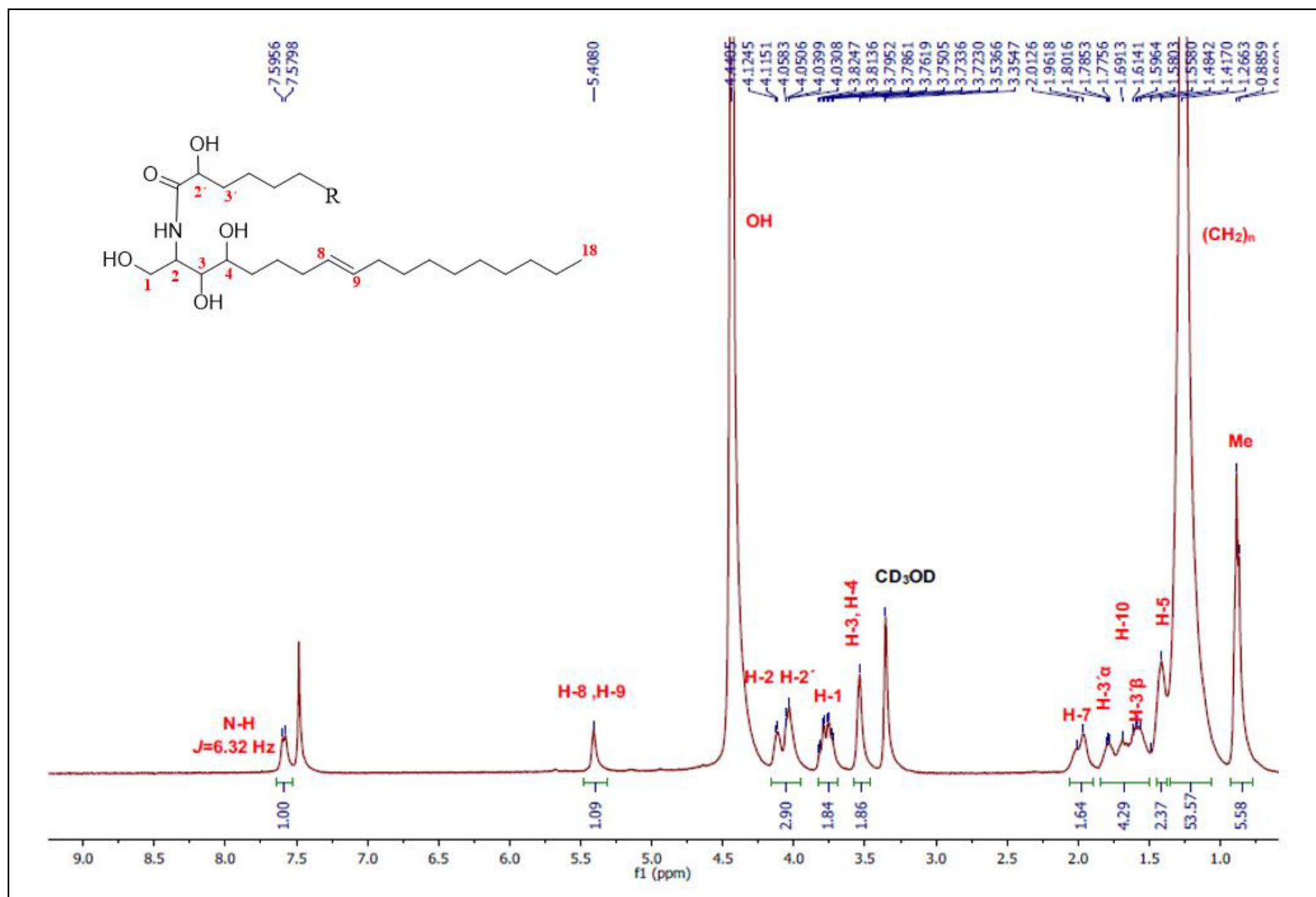
Al analizar CIH-13 por UPLC-QToF-MS se obtuvo el cromatograma que se muestra en la Figura 60, el cual reveló una sucesión de 4 picos abundantes a diferentes t_R indicando la presencia de una mezcla de compuestos homólogos. Los porcentajes de abundancia según el cromatograma fueron: 21.33% (**I**, t_R 1.61 min); 47.40 % (**II**, t_R 4.20 min); 13.27 % (**III**, t_R 9.66 min); y 18.0 % (**IV**, t_R 12.45 min); siendo el compuesto **II** el más abundante. De esta forma, los espectros HRMS-ESI (modo positivo) de cada uno de los picos mostraron iones moleculares a m/z 790 $[M+H]^+$ (**I**), 753 $[M]^+$ (**II**), 723 $[M]^+$ (**III**), y 751 $[M]^+$ (**IV**) (Figuras 61, 62, 63 y 64, espectros numéricos ver en Apéndices).

La estructura completa de CIH-13 se estableció utilizando espectros de RMN 1D y 2D en combinación con los datos arrojados de HRMS-ESI. La evidencia de una LCB 1,3,4 trihidroxilada se determinó sobre la base del patrón de fragmentación en los espectros HRMS-ESI. Con la ruptura α al carbonilo, típica en ceramidas, se obtiene el fragmento m/z 342 para las cuatro ceramidas, confirmándose la LCB de 18C trihidroxilada, tal y como lo refiere Michaelson *et al.*¹⁰¹ Otras fragmentaciones comunes en las ceramidas también son ilustradas en las Figuras 61 a la 64, como las pérdidas de los grupos hidroxilos. El largo de las cadenas de ácido graso α -hidroxilado fue determinado de la misma forma que Wang *et al.*¹⁰² donde reportaron los picos de los iones observados en los espectros HRMS-ESI. Para **I** no se pudo obtener el m/z de la VLCFA completa. Sin embargo, se pudieron observar algunos fragmentos que justificaron este ácido graso: m/z 323 $[C_{23}H_{47}]^+$, 153 $[(C_{10}H_{16}O) + 1]^+$, 167 $[C_{10}H_{17}NO]^+$ correspondientes a rupturas α al doble enlace, α al carbonilo y al nitrógeno, respectivamente (Figura 61 y espectro

numérico en Apéndices). Se ha reportado que el doble enlace en la posición 9 es una de las variaciones en las VLCFA. Como se demuestra para la ceramida **I**, además de los picos de m/z anteriores, la obtención de su pico base (m/z 441), por ruptura alílica a la doble ligadura en la VLCFA (Figura 61). Para **II** y **III**, quedaron confirmados tanto el ácido graso como la LCB por la presencia de su ión más estable, el pico base (PB). En ambos casos formado por pérdidas de H_2O (Figura 62 y 63 y espectros numéricos en Apéndices). Para **IV**, se comprobó por el m/z 406 que corresponde a $[C_{28}H_{54}O]^+$ (Figura 64). De acuerdo a la literatura, las cadenas de ácido graso pueden presentar diversas modificaciones, siendo la α -hidroxilación (posición 2') la más común.¹⁰¹ No obstante, hay reportes de ceramidas aisladas con hidroxilaciones en los carbonos 2' y 3', tal y como aparece en el trabajo de Hussain *et al.*¹⁰³ Lo anterior coincide con **II**, y se sustenta con la señal adicional observada en δ_C 72.51, que sería el C3' (sólo en este compuesto), exponiendo la existencia de cuatro metinos unidos a grupos hidroxilo. En RMN 1H , éste se ubica en δ 4.04, según el espectro HSQC. Otras modificaciones para el componente ácido graso de la ceramida serían la ausencia de hidroxilación, su longitud variable, y la insaturación en la posición ω -9.¹⁰¹ Los resultados obtenidos en nuestra investigación son ampliamente coincidentes con los estudios previos realizados a esfingolípidos, particularmente ceramidas, esto es referido a las modificaciones principales de la LCB en plantas: hidroxilación en C4 y la insaturación Δ 8. Siendo esta última, ausente en mamíferos y hongos, pero muy común en plantas y levaduras. De igual forma se manifiestan congruencias para las variaciones en las cadenas de ácido graso anteriormente expuestas y las de la literatura.^{101,104} Por otra parte, se ha reportado que las configuraciones absolutas de C2, C3, C4 y C2' en todos los esfingolípidos aislados de plantas son 2*S*, 3*S*,

4*R* y 2'*R*. Según la investigación de Sugiyam *et al.*¹⁰⁵, un método eficaz para determinar la estereoquímica de los glucoesfingolípidos es una comparación con los datos espectroscópicos de aquellos que tienen configuraciones conocidas, sean productos sintéticos o naturales.¹⁰⁵ En el caso de las ceramidas **I-IV** no fue posible asignar la configuración de los centros quirales en 2, 3, 4 y 2' porque los desplazamientos químicos de CIH-13 aunque son similares a los análogos sintéticos¹⁰⁵ y naturales¹⁰⁶ con configuración conocida (Tabla 19), CIH-13 es una mezcla y no es un compuesto puro. Por lo que es necesario realizar una metanólisis a CIH-13 y posterior medición de la rotación óptica de la LCB acetilada y del metil éster del ácido graso obtenidos. Esto con el objetivo de determinar las configuraciones en 2, 3, 4 y 2' por comparación con los datos ya reportados.

Las señales en δ_C 131.0 (C8), δ_C 130.21 (C9) y δ_H 5.41 demostraron la presencia de doble enlace. Se determinó que el mismo era *trans* debido a los desplazamientos químicos alílicos en δ_C 32.92 (C7) y δ_C 33.07 (C10), siendo reportado en la literatura que los isómeros (*E*) aparecen alrededor de 32 ppm, mientras que los (*Z*) en 27-28 ppm.¹⁰⁷ La ubicación del doble enlace fue en la posición 8 de la LCB atendiendo al origen biogénico¹⁰¹ y por los fragmentos *m/z* 153 y *m/z* 127 de las cuatro ceramidas en HRMS-ESI (Figuras 61, 62 63 y 64); además de las correlaciones COSY observadas de los hidrógenos vinílicos H-8/H-9 (δ 5.41), con H-7 (δ 1.98). No obstante, sería recomendable realizar la derivatización de la doble ligadura con disulfuro de dimetilo con la obtención del derivado de dimetil disulfuro correspondiente, para confirmar la posición del doble enlace.¹⁰⁹



* Estructura general de las ceramidas caracterizadas en CIH-13

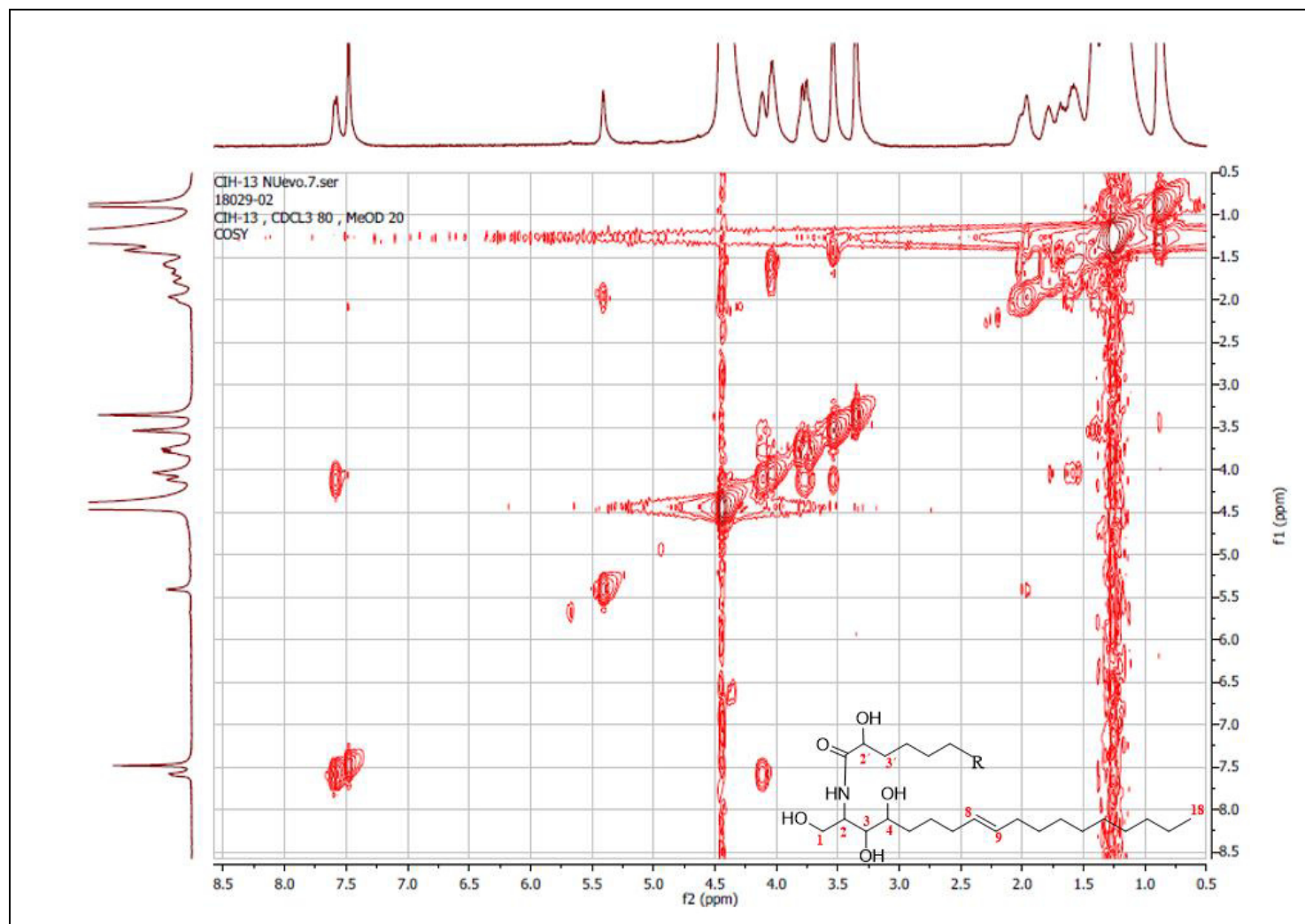


Figura 57. Espectro COSY de CIH-13

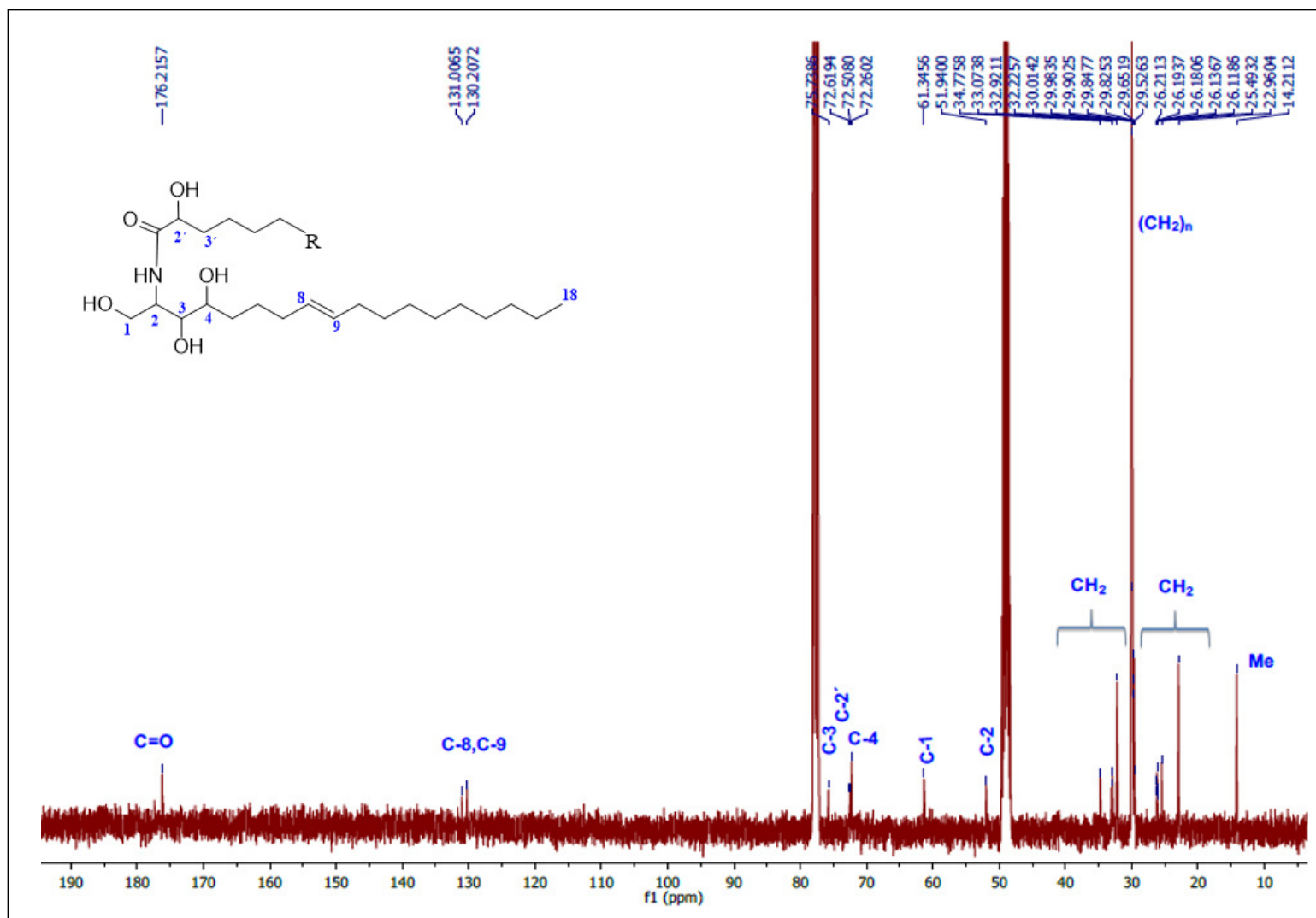


Figura 58. Espectro RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃/CD₃OD 80:20) de **CIH-13**

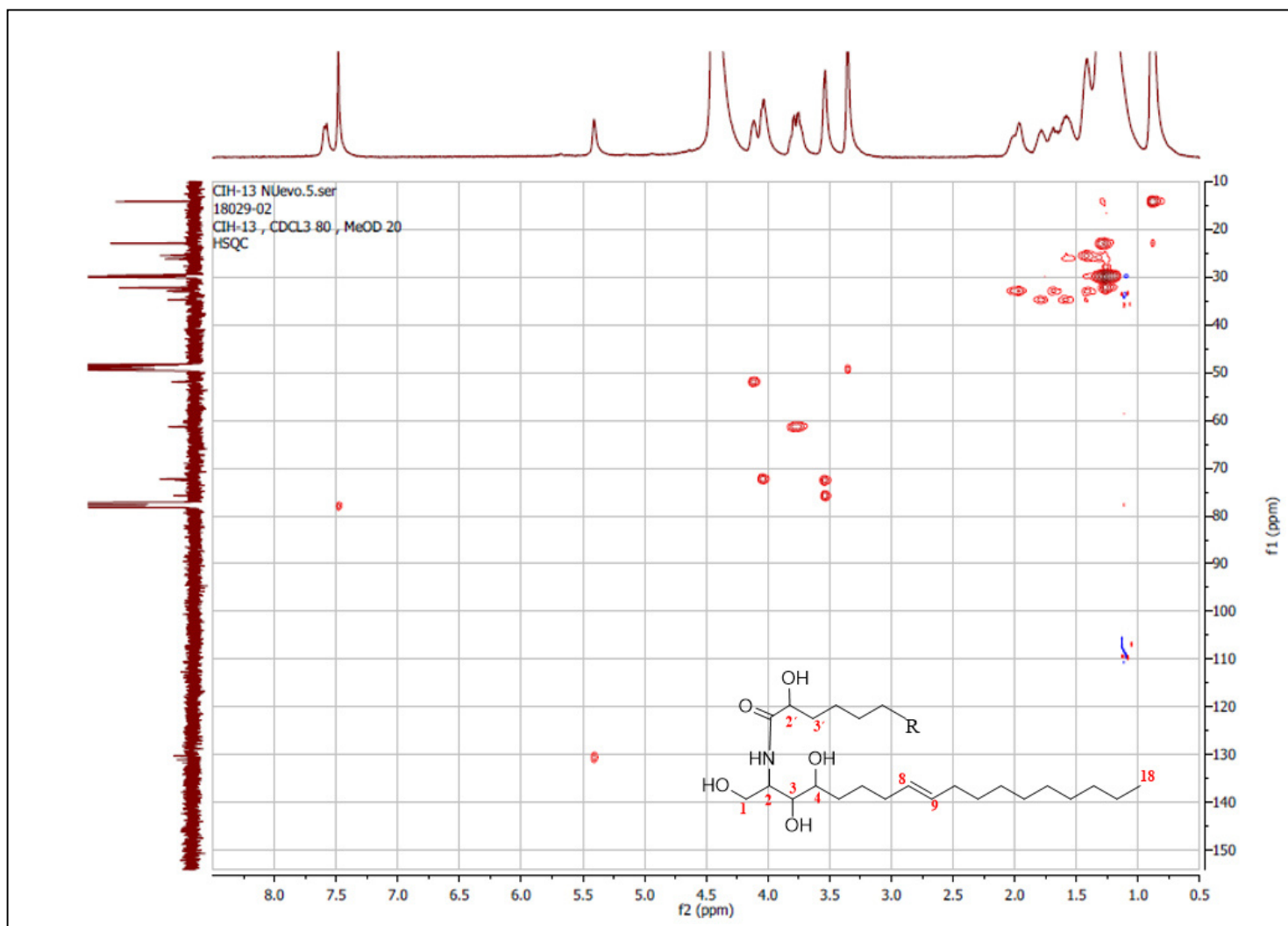


Figura 59. Espectro HSQC de **CIH-13**

La comparación de datos espectroscópicos con una ceramida previamente caracterizada, resultó útil para completar las asignaciones (Tabla 20). Es oportuno explicar que las integraciones mostradas en RMN ^1H no son congruentes con la totalidad de protones, al ser CIH-13 una mezcla, no obstante, resultan útiles en la interpretación de los espectros. En base a las evidencias anteriores, CIH-13 se determinó como una mezcla de cuatro ceramidas: 2-(tritriacont-9-enoil amino)-1,3,4-octadecanotriol-8-eno (**I**); 2-(2',3'-dihidroxi octacosanoil amino)-1,3,4-octadecanotriol-8-eno (**II**); 2-(2'-hidroxiheptacosanoil amino)-1,3,4-octadecanotriol-8-eno (**III**); 2-(2'-hidroxinonacosanoil amino)-1,3,4-octadecanotriol-8-eno (**IV**). Es el primer reporte en la literatura de las ceramidas **I**, **II** y **IV**; mientras que **III** ya ha sido caracterizada previamente en *Citrus sinensis*, siendo la primera vez que se reporta en *Cissus*.

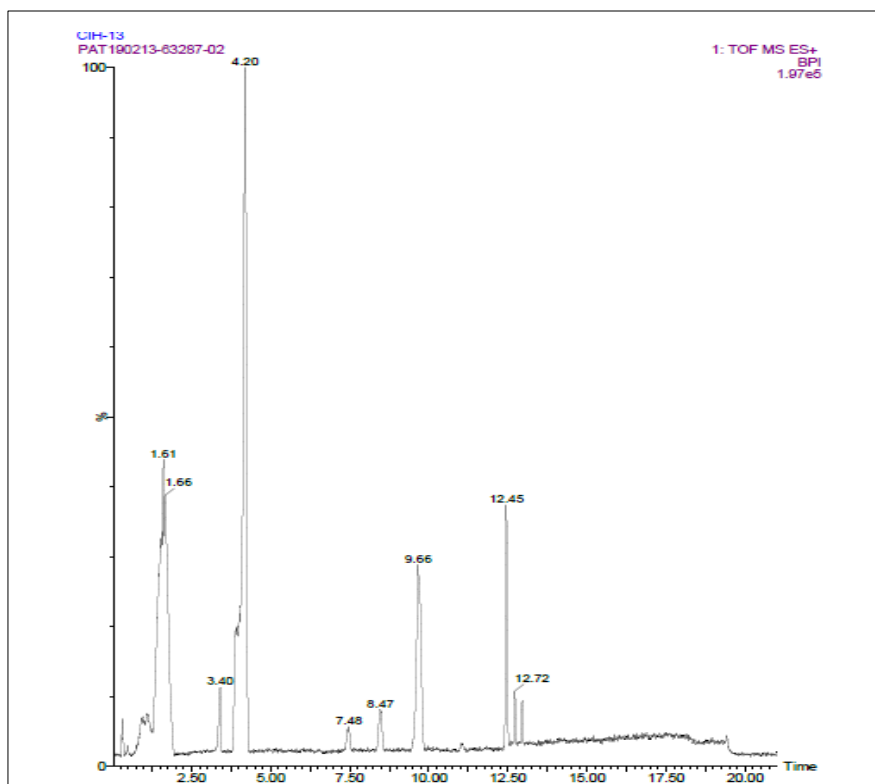


Figura 60. Cromatograma de UPLC-QToF-MS de **CIH-13**

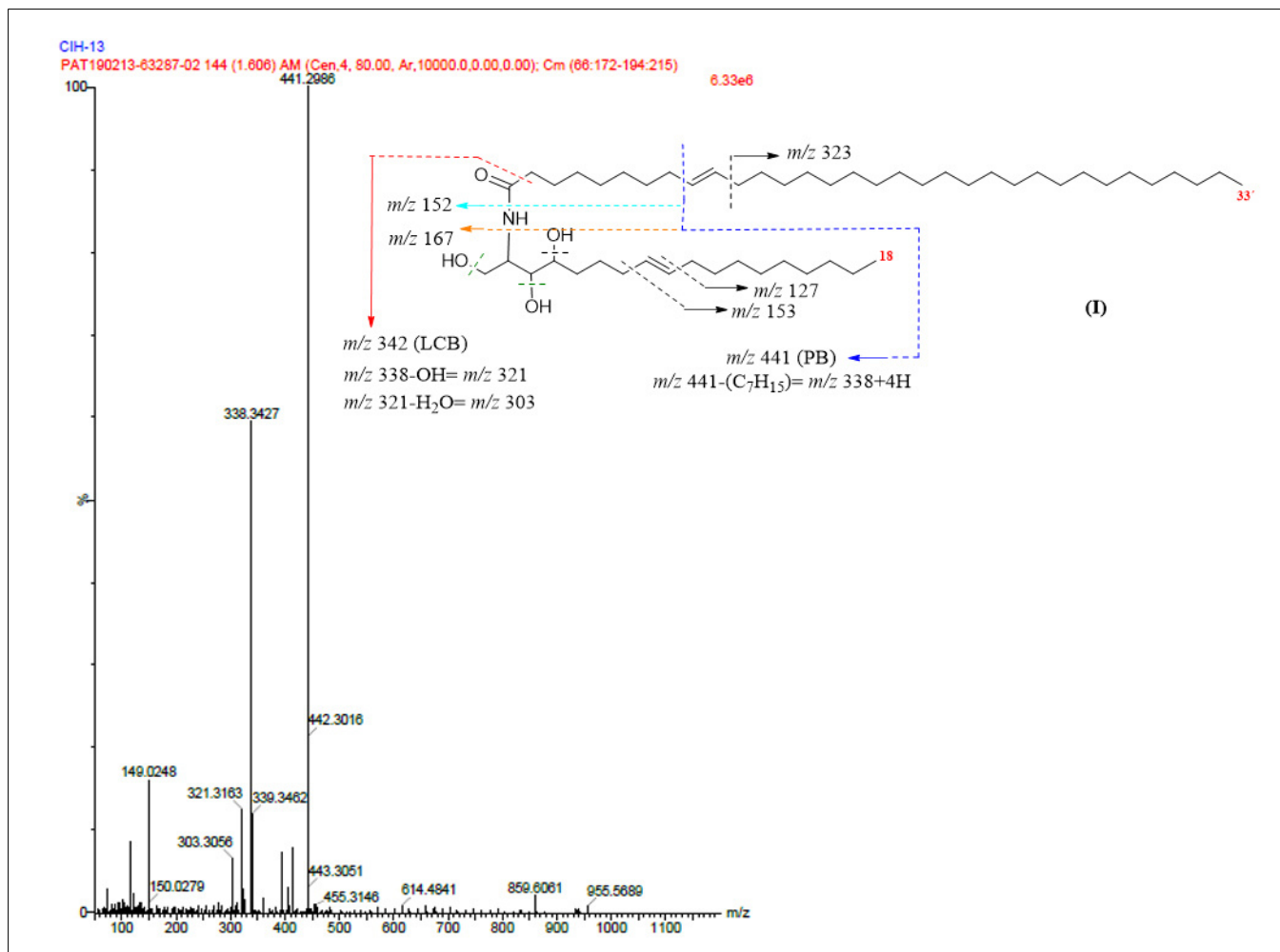


Figura 61. Espectro HRMS-ESI de **CIH-13-I** (espectro numérico en Apéndices)

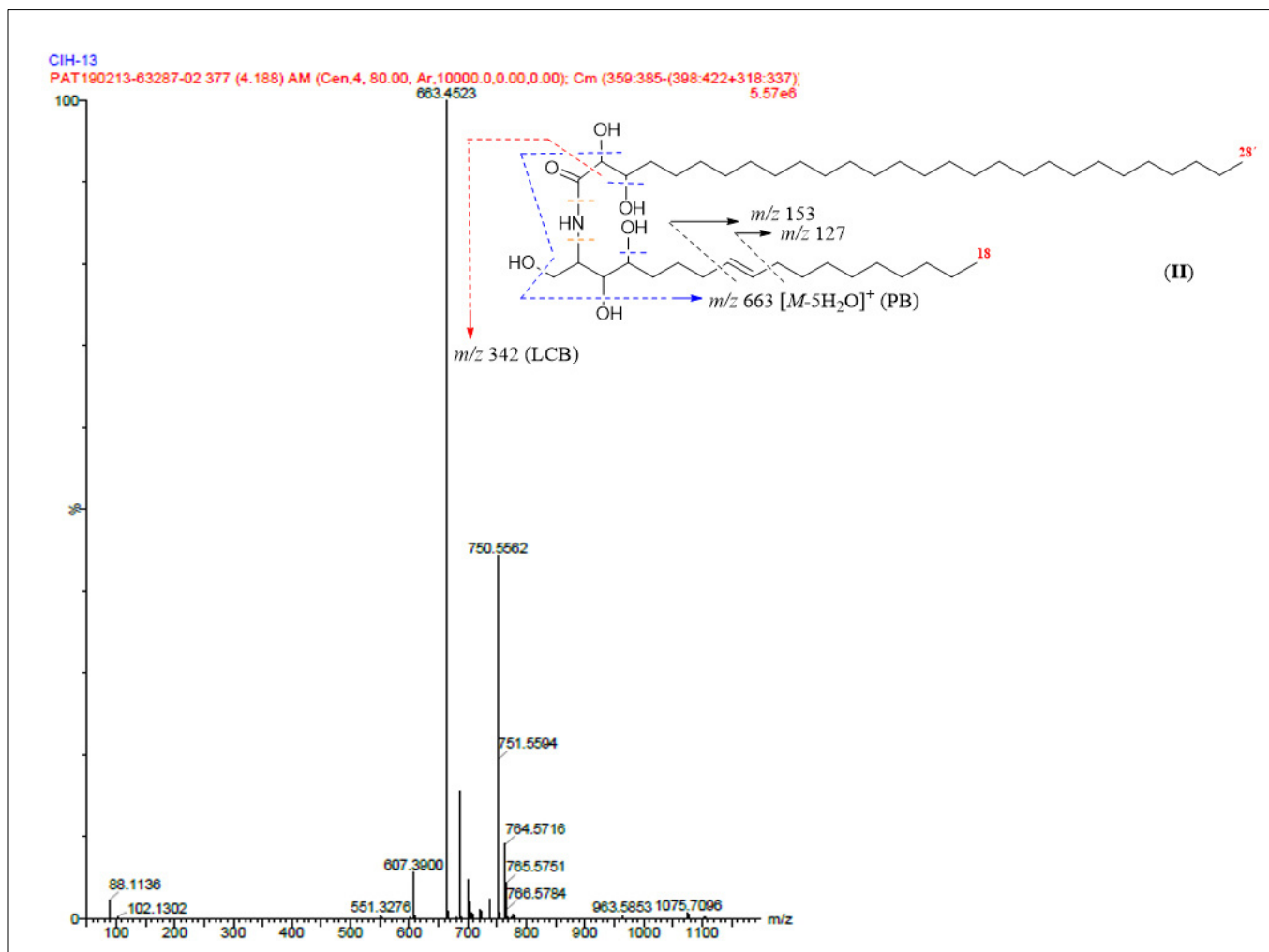


Figura 62. Espectro HRMS-ESI de **CIH-13-II** (espectro numérico en Apéndices)

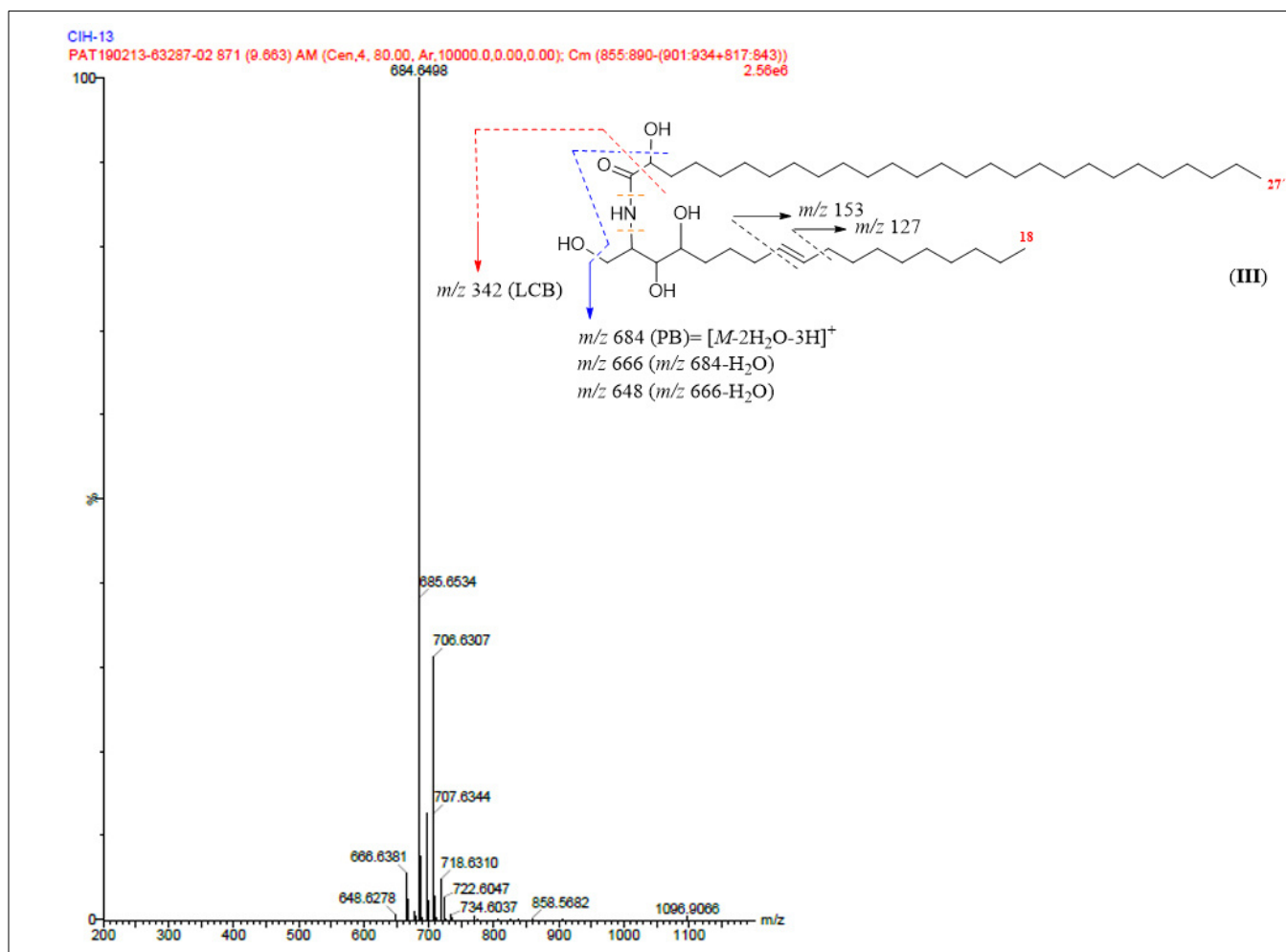


Figura 63. Espectro HRMS-ESI de CIH-13-III (espectro numérico en Apéndices)

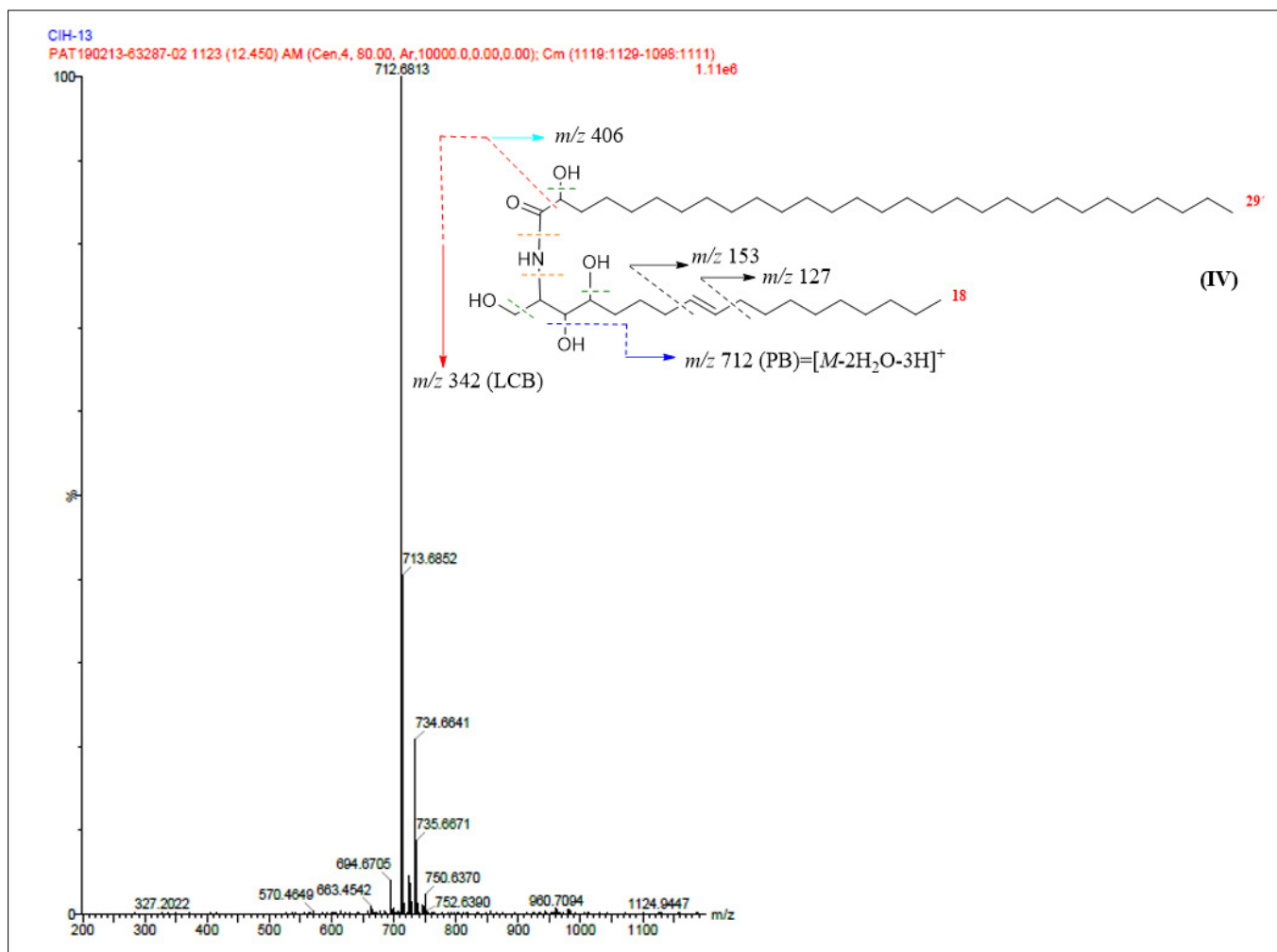


Figura 64. Espectro HRMS-ESI de **CIH-13-IV** (espectro numérico en Apéndices)

Tabla 19. Datos espectroscópicos RMN ¹H de ceramidas sintética y naturales

Posición	CIH-13	Análogo sintético ¹⁰⁵	Ceramida natural ¹⁰⁶
1	3.78 m	3.91 (dd, <i>J</i> =11.6, 2.8 Hz, H-1 α) 3.75 (dd, <i>J</i> =11.6, 5.6 Hz, H-1 β)	3.76 (dd, <i>J</i> =11.2, 4.6 Hz) 3.78 (dd, <i>J</i> =11.2, 4.6 Hz)
2	4.12 m	4.14 m	4.13 m
3	3.54 m	3.54-3.67 m	3.55 m
4	3.54 m	3.54-3.67 m	3.54 m
2'	4.04 m	4.04 (dd, <i>J</i> =6.3, 4.9 Hz)	4.04 (dd, <i>J</i> =7.8, 3.8 Hz)
Me	0.88 m	0.88 (t, <i>J</i> =6.8 Hz)	0.88 (t, <i>J</i> =6.9 Hz)

Tabla 20. Comparación de datos espectroscópicos de **CIH-13** con ceramida aislada de *Cordia platythyrsa*

Posición	Referencia ¹⁰⁶		Datos obtenidos	
	RMN ¹ H (CDCl ₃ , 600 MHz)	RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 150 MHz)	RMN ¹ H (CDCl ₃ /MeOD 8:2, 400 MHz)	RMN ¹³ C (CDCl ₃ /MeOD 8:2, 100 MHz)
1	3.76 (dd, <i>J</i> (Hz)=11.2, 4.6) 3.78 (dd, <i>J</i> (Hz)=11.2, 4.6)	60.2	3.78 m	61.35
2	4.13 m	50.9	4.12 m	51.94
3	3.55 m	74.5	3.54 m	75.71
4	3.54 m	71.4	3.54 m	72.26
5	1.61 m, 1.70 m	33.7	1.42 m	32.92
7	2.03 m	31.8	1.98 m	32.92
8	5.41 (t, <i>J</i> (Hz)=3.4)	129.8	5.41 m	131.01
9	5.41 (t, <i>J</i> (Hz)=3.4)	129.3	5.41 m	130.21
10	1.98 m	31.8	1.69 m	33.07
CH ₂	1.26-1.31 sa	21.8-31.1	1.27 sa	22.96-32.23
Me	0.88 (t, <i>J</i> (Hz)=6.9)	12.8	0.88 m	14.21
1'	-	175.0	-	176.22
2'	4.04 (dd, <i>J</i> (Hz)=7.8, 3.8)	71.1	4.04 m	72.62
3'	1.62 m 1.78 m	33.8	H-3' β -1.58 m H-3' α -1.78 m	34.78
NH	ND*	-	7.59 (d, <i>J</i> (Hz)=6.32)	-

*No determinado

5.1.2.12 Propiedades físicas y espectroscópicas de CIH-13Ac

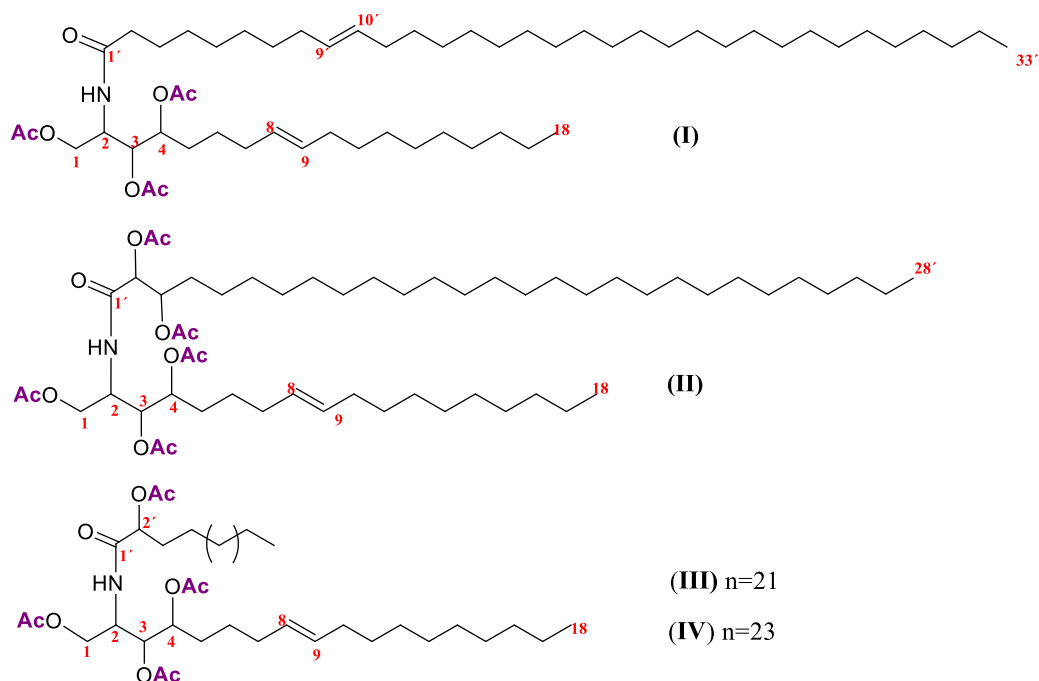


Figura 65. Estructuras de los compuestos en **CIH-13Ac**

Sólido amorfo de color blanco-amarillento, soluble en CHCl_3 , pf 55-57°C. **I**: $\text{C}_{57}\text{H}_{105}\text{NO}_7$ ($\text{PM}_{\text{calc.}}$ 915.79 g/mol); **II**: $\text{C}_{56}\text{H}_{101}\text{NO}_{11}$ ($\text{PM}_{\text{calc.}}$ 963.74 g/mol); **III**: $\text{C}_{53}\text{H}_{97}\text{NO}_9$ ($\text{PM}_{\text{calc.}}$ 891.72 g/mol); **IV**: $\text{C}_{55}\text{H}_{101}\text{NO}_9$ ($\text{PM}_{\text{calc.}}$ 919.75 g/mol), (estructuras mostradas en Figura 65). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 0.90 (t, $J=6.66$ Hz, Me), 1.27 (sa, CH_2), 1.65 (m, H-5), 1.84 (m, H-3'), 1.99 (m, H-7, H-10), 2.05 (s, $\underline{\text{CH}_3\text{CO-1}}$), 2.08 (s, $\underline{\text{CH}_3\text{CO-4}}$), 2.11 (s, $\underline{\text{CH}_3\text{CO-3}}$), 2.20 (s, $\underline{\text{CH}_3\text{CO-2'}}$), 4.03 (dd, $J=11.64$ Hz; 3.14 Hz, H-1 β), 4.36 (dd, $J=11.72$ Hz; 6.36 Hz, H-1 α), 4.46 (m, H-2), 4.97 (m, H-4), 5.12 (m, H-3, H-2'), 5.36 (m, H-9), 5.42 (m, H-8), 6.65 (d, $J=9.08$ Hz, NH). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 14.13 (Me), 20.70 ($\underline{\text{CH}_3\text{CO-1}}$), 20.77 ($\underline{\text{CH}_3\text{CO-4}}$), 20.88 ($\underline{\text{CH}_3\text{CO-3}}$), 21.03 ($\underline{\text{CH}_3\text{CO-2'}}$), 22.71 (CH_2), 24.91 (CH_2), 25.53 (CH_2), 28.57 (CH_2), 29.25 (CH_2), 29.34 (CH_2), 29.38

(CH₂), 29.45 (CH₂), 29.57 (CH₂), 29.60 (CH₂), 29.62 (CH₂), 29.63 (CH₂), 29.68 (CH₂), 29.72 (CH₂), 31.80 (CH₂), 31.94 (C3'), 32.21 (C10), 32.61 (C7), 47.84 (C2), 62.41 (C1), 72.25 (C-2'), 72.73 (C4), 74.03 (C3), 129.29 (C9), 131.19 (C8), 170.00 (C1'), 170.02 (CH₃CO-4), 170.05 (CH₃CO-1), 170.95 (CH₃CO-3), 171.31 (CH₃CO-2').

5.1.2.12.1 Elucidación estructural de CIH-13Ac

Las ceramidas CIH-13 fueron acetiladas y como consecuencia se obtuvieron los correspondientes derivados acetilados, los cuales fueron analizados por RMN ¹H y ¹³C. El espectro de RMN ¹H (Figura 66) mostró los datos espectroscópicos que confirmaron la estructura principal de la ceramida natural: una señal a campo alto correspondiente a los metilos terminales en δ 0.90, a continuación, una señal ancha correspondiente a las cadenas alifáticas (δ 1.27), metino unido a nitrógeno (δ 4.46), por último, el protón de la amida secundaria en 6.65 ppm ($J=9.04$ Hz) respaldado por la señal de su carbonilo en δ_C 170 (C1'). En la región comprendida entre δ 4 y 5.12 ppm, encontramos a los hidrógenos base de los grupos ésteres (H-1 α , H-1 β , H-3, H-4, H-2'). El derivado acetilado presentó igualmente las señales propias de un doble enlace en δ_H 5.36 (H-9) y δ_H 5.42 (H-8), cuya integración no coincide con los protones del doble enlace, al ser CIH-13Ac una mezcla. No obstante, en RMN ¹³C (Figura 68) se observaron los carbonos de la doble ligadura en δ 129.29 (C9) y 131.18 (C8), que se comprueban igualmente en el DEPT 135 (Ver Apéndices) donde aparecen los metinos correspondientes. La doble ligadura se ubicó en la posición 8 de la LCB atendiendo a las consideraciones biogénicas¹⁰¹ y sustentado por las correlaciones COSY (Figura 67) entre H-7/H-8 (δ_H 1.99/ δ_H 5.42) y HMBC (Figura 70) entre H-7/C-9 (δ_H 1.99/129.29). El doble enlace se determinó que fuera *trans*, de acuerdo a los desplazamientos químicos de los carbonos adyacentes a C=C, al reportar la literatura

que los isómeros (*E*) aparecen alrededor de 32 ppm.¹⁰⁷ El esqueleto de la ceramida fue asignado utilizando el experimento HSQC (Figura 69) al observar las correlaciones directas de protones con sus respectivos carbonos y por comparación con los datos espectroscópicos de un derivado similar obtenido por Lin *et al.*¹⁰⁸ a partir de las raíces de *Gynura japonica* (Tabla 22). La presencia de una LCB 1,3,4-triacetilada se dedujo de los datos del espectro de COSY (Figura 67). De esta forma, la señal en δ_H 6.65 (NH), dió un pico cruzado con la señal en δ_H 4.46 (H-2) que, a su vez, mostró picos cruzados con protones de metileno (CH₂-1) en δ_H 4.36 y δ_H 4.03 y con H-3 en δ_H 5.12. Este último se correlacionó con la señal a δ_H 4.97 perteneciente a H-4. La unión de la LCB al ácido graso se confirmó por la correlación HMBC entre H-1 α y C1' (δ_H 4.36 y δ_C 170.00). Aunque la literatura reporta que la configuración absoluta de C2, C3, C4 y C2' en los esfingolípidos naturales y derivados es (2*S*, 3*S*, 4*R*, 2'*R*)¹⁰⁵, no fue posible establecerla en este caso por comparación, al ser CIH-13Ac una mezcla. La acetilación del producto natural quedó comprobada al observar cuatro singuletes de grupos acetilos en δ_H (ppm): 2.05 (CH₃CO-1), 2.08 (CH₃CO-4), 2.11 (CH₃CO-3), 2.20 (CH₃CO-2'); con sus respectivos carbonos en δ_C (ppm): 20.70 (CH₃CO-1), 20.77 (CH₃CO-4), 20.88 (CH₃CO-3), 21.03 (CH₃CO-2'), y los carbonilos de los ésteres correspondientes en δ_C (ppm): 170.02 (CH₃CO-4), 170.05 (CH₃CO-1), 170.95 (CH₃CO-3), 171.31 (CH₃CO-2').

Los datos espectroscópicos de CIH-13Ac se compararon con los de otro esfingolípido acetilado previamente descrito¹⁰⁸, resultando ser muy similares (Tabla 21). Como se mencionó anteriormente, las integraciones mostradas en RMN ¹H no son congruentes con la totalidad de protones, no obstante, son útiles en la interpretación de los espectros. Con base en la evidencia anterior, **CIH-13Ac** se identificó como una mezcla de cuatro

ceramidas acetiladas: 2-(tritriacont-9-enoil amino)-1,3,4- octadecanotriacetat-8-eno (**I**); 2-(2',3'-diacetoxioctacosanoil amino)-1,3,4-octadecanotriacetat-8-eno (**II**); 2-(2'-acetoxiheptacosanoil amino)-1,3,4-octadecanotriacetat-8-eno (**III**); y 2-(2'-acetoxinonacosanoil amino)-1,3,4-octadecanotriacetat-8-eno (**IV**). Es la primera caracterización de estos derivados de productos naturales pues no se tiene reportes de ellos en la literatura.

Tabla 21. Comparación de datos espectroscópicos de **CIH-13Ac** con análogo acetilado

Posi ción	Referencia ¹⁰⁸		Datos obtenidos	
	RMN ¹ H	RMN ¹³ C	RMN ¹ H	RMN ¹³ C
1	1 α - 4.34 (dd, <i>J</i> (Hz)= 6.4, 11.9) 1 β - 4.01 (dd, <i>J</i> (Hz)= 3.0, 11.9)	62.30	1 α - 4.36 (dd, <i>J</i> (Hz) =11.72, 6.36) 1 β - 4.03 (dd, <i>J</i> (Hz) =11.64, 3.14)	62.41
2	4.45 m	47.90	4.46 m	47.84
3	5.10 m	74.00	5.12 m	74.03
4	5.09 m	72.60	4.97 m	72.73
7	1.95 m	32.60	1.99 m	32.61
8	5.36 (dt, <i>J</i> (Hz)= 5.4, 15.6)	131.20	5.42 m	131.19
9	5.39 (dt, <i>J</i> (Hz)= 5.6, 15.6)	129.30	5.36 m	129.29
10	1.95 m	32.20	1.99 m	32.21
CH ₂	1.25 sa	29.2-29.7	1.27 sa	
Me	0.88 (t, <i>J</i> (Hz)=6.8)	14.10	0.90 (t, <i>J</i> (Hz)=6.66)	14.13
NH	6.63 (d, <i>J</i> (Hz)=9.2)	-	6.65 (d, <i>J</i> (Hz)=9.08)	-
1'	-	NR*	-	170.00
2'	4.95 (da, <i>J</i> (Hz)=6.4)	72.70	5.12 m	72.25
3'	1.80 m	31.90	1.84 m	31.94
CH ₃ CO-1	2.03 s	20.60	2.05 s	20.70
CH ₃ CO-3	2.09 s	20.80	2.11 s	20.88
CH ₃ CO-4	2.06 s	20.70	2.08 s	20.77
CH ₃ CO-2'	2.18 s	21.00	2.20 s	21.03
CH ₃ CO-1	-	170.00	-	170.05
CH ₃ CO-3	-	170.90	-	170.95
CH ₃ CO-4	-	170.00	-	170.02
CH ₃ CO-2'	-	171.30	-	171.31

RMN ¹H (CDCl₃ 400 MHz). RMN ¹³C (CDCl₃100 MHz).

*NR: No reportado en el artículo de referencia

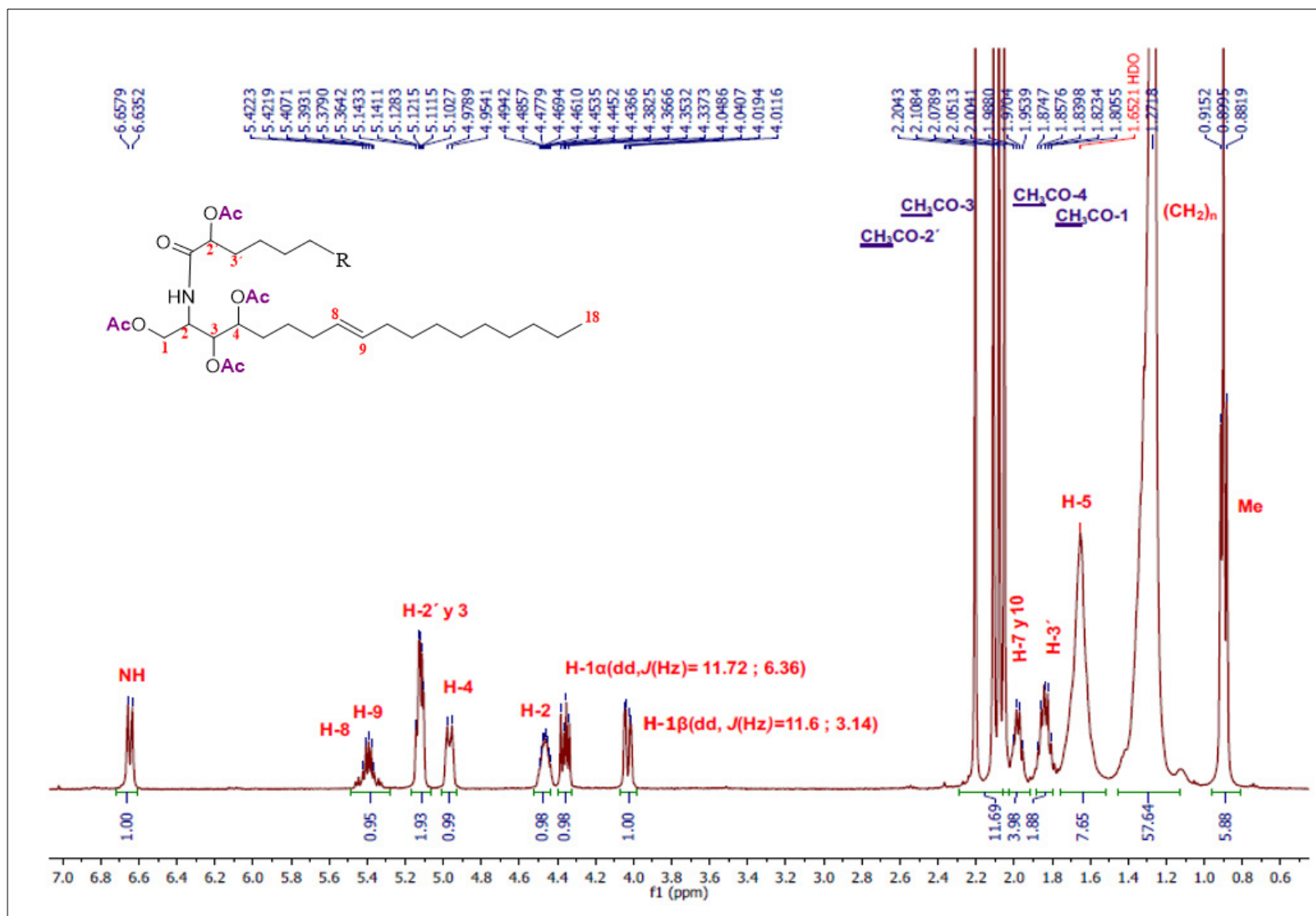


Figura 66. Espectro RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de CIH-13Ac

* Estructura general de las ceramidas caracterizadas en CIH-13Ac

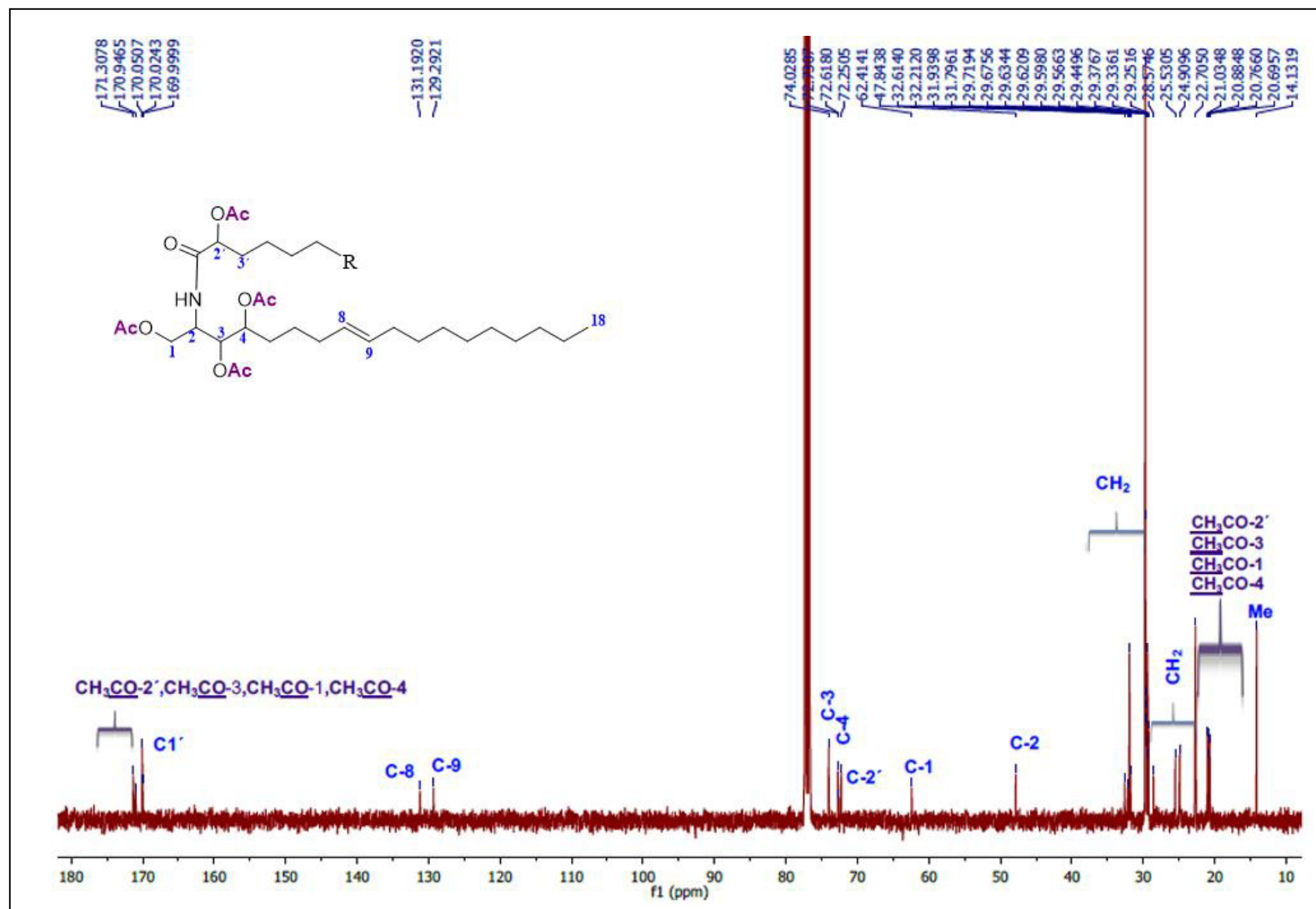


Figura 68. Espectro RMN ^{13}C (100 MHz CDCl_3) de CIH-13Ac

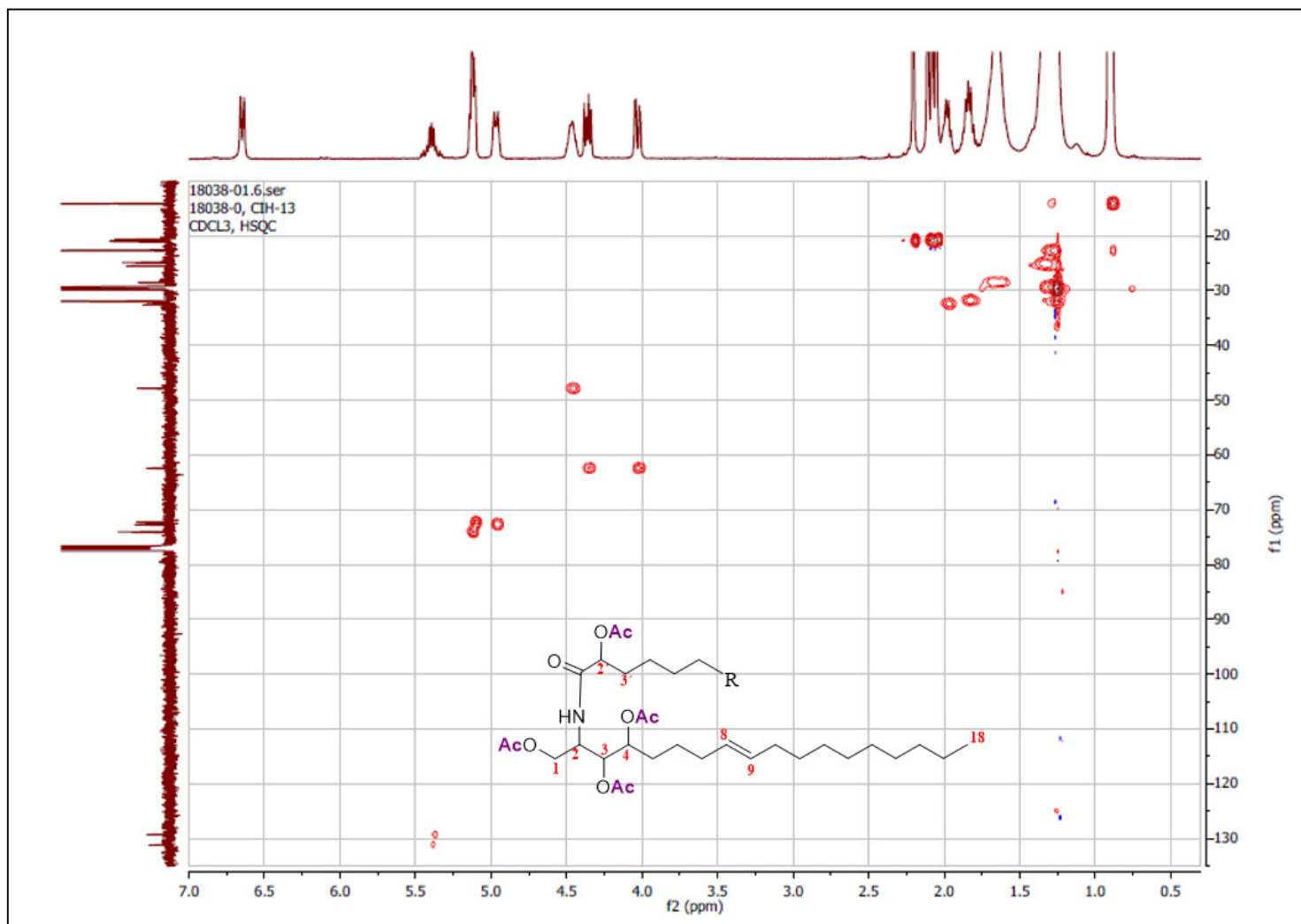


Figura 69. Espectro HSQC de CIH-13Ac

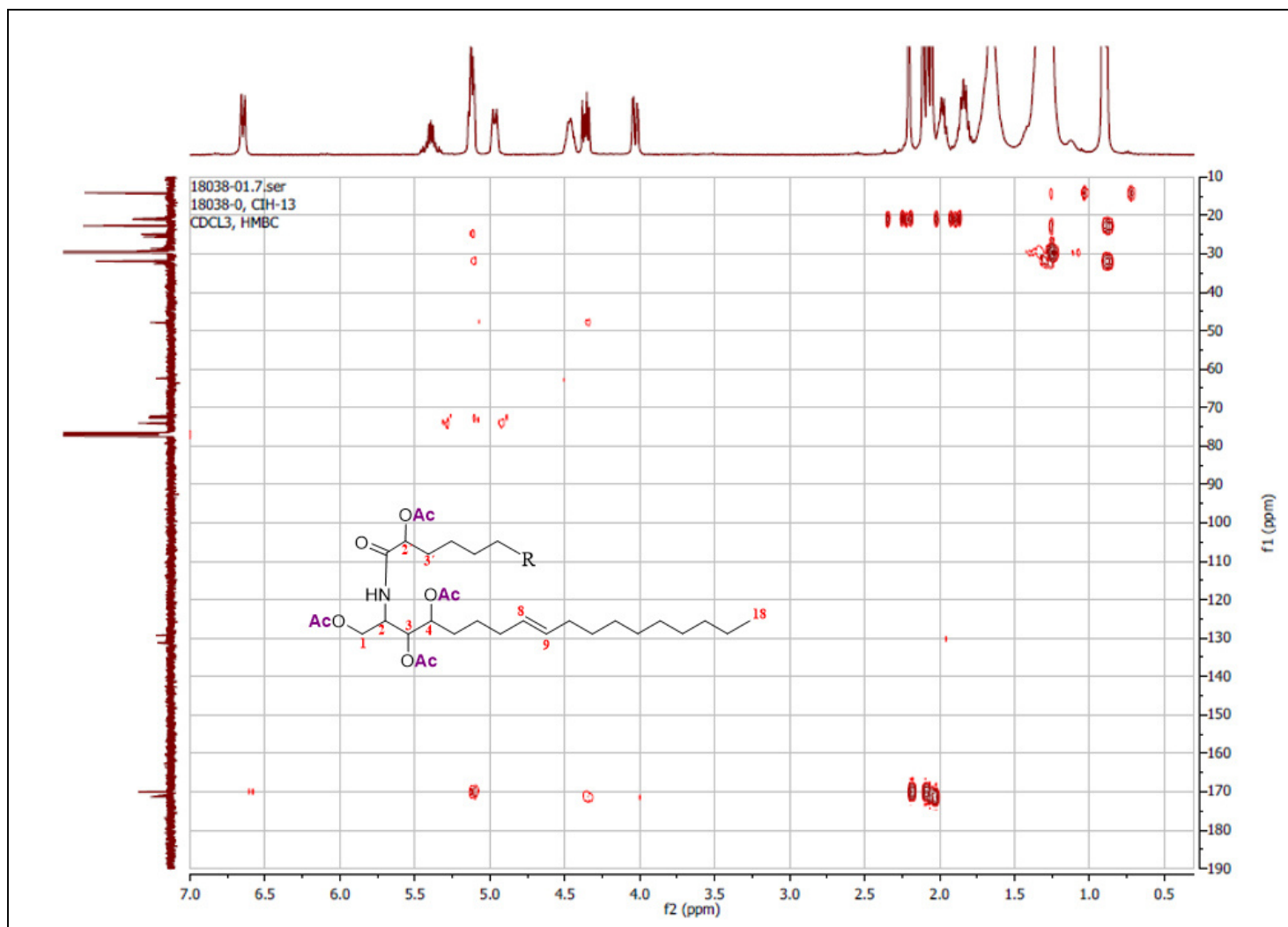


Figura 70. Espectro HMBC de CIH-13Ac

5.1.2.13 Propiedades físicas y espectroscópicas de 2-(2'-hidroxidecanoil amino)-1,3,4-hexadecanotriol-8-eno (CIH-15)

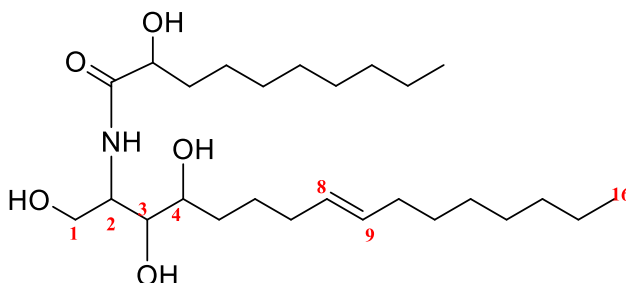


Figura 71. Estructura de 2-(2'-hidroxidecanoil amino)-1,3,4-hexadecanotriol-8-eno (CIH-15)

Sólido blanco amorfo, soluble en DMSO, pf 123-125°C, HRMS-ESI (modo de ionización positiva) m/z : 475 $[M+H_2O]^+$, 457.3250 $[M]^+$ ($C_{26}H_{51}NO_5$, calc. 457.3767), (estructura mostrada en Figura 71). RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 0.90 (t, $J=6.66$ Hz, 6H, Me), 1.28 (sa, CH_2), 1.62 (m, CH_2), 1.99 (m, 2H, H-10), 2.05 (m, 2H, H-7), 3.65 (m, 2H, H-3, H-4), 3.82 (m, 1H, H-1 β), 3.97 (m, 3H, H-2', H-1 α), 4.17 (m, 4H, H-2), 5.42 (m, 2H, H-8 y H-9), 7.02 (m, 1H, NH). RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 14.13 (Me), 22.70 (CH_2), 24.18 (CH_2), 24.96 (CH_2), 29.37 (CH_2), 29.48 (CH_2), 29.72 (CH_2), 31.92 (C7), 31.94 (C10), 35.04 (C3'), 54.82 (C2), 64.78 (C1), 69.95 (C2'), 71.63 (C4), 74.46 (C3), 129.10 (C9), 129.48 (C8), 176.71 (C1').

5.1.2.13.1 Elucidación estructural de 2-(2'-hidroxidecanoil amino)-1,3,4-hexadecanotriol-8-eno (CIH-15)

Al analizar los espectros de RMN 1H (Figura 72) y RMN ^{13}C (Figura 73), de este compuesto pudimos observar patrones similares a CIH-13, indicando que ambos poseían el mismo esqueleto estructural. Como señales indicativas de las ceramidas encontramos un doblete en δ_H 7.02

correspondiente al protón de la amida que se encuentra respaldado por la señal de su carbonilo en δ_C 176.71; metilos terminales en δ_H 0.90 (t, $J=6.66$ Hz), protones de metilenos desde δ_H 1.28 a 2.05 correspondientes a las cadenas alifáticas; un metino unido a nitrógeno (δ_H 4.17, δ_C 54.82); un metileno hidroxilado (δ_H 3.82 y δ_H 3.97, δ_C 64.78) y dos metinos hidroxilados (δ_H 3.65, δ_C 74.46 y δ_C 77.22). La ceramida CIH-15 fue analizada por CG-EM, obteniéndose el cromatograma que se muestra en la Figura 74. Se identificó como compuesto mayoritario el correspondiente al $t_R=105.92$ min, que presentó 85% de abundancia, otros picos detectados no fueron caracterizados por su bajo porcentaje de abundancia (<15%). Es pertinente mencionar que el pico detectado a 88.30 min corresponde al bis (2-etilhexil) ftalato, un plastificante considerado contaminante en nuestro análisis. Como resultado de la técnica empleada, se obtuvo el espectro de EM-IE (Figura 75) que muestra el m/z 405 correspondiente a la pérdida de tres hidroxilos, lo que comúnmente ocurre en las ceramidas. Se propuso una base esfingoide 1,3,4 trihidroxilada atendiendo a los reportes sobre ceramidas naturales mencionados anteriormente.^{101,104} La misma quedó confirmada en EM-IE por el ion a m/z 287, correspondiente a la LCB $C_{16}H_{33}NO_3$ (Figura 76). De igual forma el largo del ácido graso hidroxilado quedó justificado por los iones m/z 171 ($C_{10}H_{19}O_2$) y m/z 187 ($C_{10}H_{20}NO_2$) obtenidos en EM-IE. Otras rupturas comunes en las ceramidas como las pérdidas sucesivas de OH y la ruptura α al carbonilo son igualmente ilustradas en la Figura 76. Al analizar CIH-15 por HRMS-ESI en modo positivo se obtuvo el espectro de la Figura 77. El ion de m/z 475.3250 fue consistente con $[M+H_2O]^+$, determinando a CIH-15 como la ceramida $C_{26}H_{51}NO_5$. Investigaciones previas han demostrado que tanto el desplazamiento químico, como la multiplicidad y las constantes de acoplamiento de H-1, H-2, H-3, H-4, H-2' para los esfingolípidos proporcionan información para la determinación de la estereoquímica relativa.¹⁰⁵ En este sentido, se compararon

los desplazamientos químicos de la ceramida en estudio con los datos ya reportados de ceramidas naturales¹⁰⁶ y sintética¹⁰⁵, encontrando similitudes entre ellos (Tabla 22). Sin embargo, no se pudo proponer la estereoquímica relativa de CIH-15 porque no se observó con claridad la multiplicidad y las constantes de acoplamiento en esas posiciones. Sería recomendable realizar una metanólisis, y medir la rotación óptica de la LCB acetilada y del metil éster del ácido graso obtenidos y compararlos con los datos previamente reportados, con lo cual se confirmarían las configuraciones propuestas en las investigaciones anteriormente citadas.

Adicionalmente, el RMN ¹H también reveló la presencia de protones olefínicos a δ_H 5.42 atribuibles a un doble enlace, respaldado por dos carbonos etilénicos en δ_C 129.10 y δ_C 129.48. La posición del doble enlace se fijó en C8-C9 atendiendo al trabajo de Michaelson *et al.*¹⁰¹, al cual se ha hecho referencia anteriormente. La confirmación se encontró en el espectro EM-IE con los fragmentos *m/z* 161 (C₇H₁₅NO₃) y 187 (C₉H₁₇NO₃) resultantes de la ruptura de la LCB a ambos lados del doble enlace (Figura 77). No obstante, una derivatización con disulfuro de dimetilo sería recomendable para confirmar la posición del doble enlace. Se determinó que este enlace fuera *trans*, de acuerdo a los desplazamientos químicos de los carbonos alílicos: δ_C 31.94 (C7) y δ_C 31.92 (C10).

Por comparación con un esfingolípido análogo se logró completar la elucidación del esqueleto estructural (Tabla 23). Con los datos y discusión anteriores, CIH-15 se caracterizó como 2-(2'-hidroxidecanoil amino)-1,3,4-hexadecanotriol-8-eno. No se tienen evidencias en la literatura de esta ceramida, siendo nuestro estudio el primer reporte de su aislamiento y caracterización.

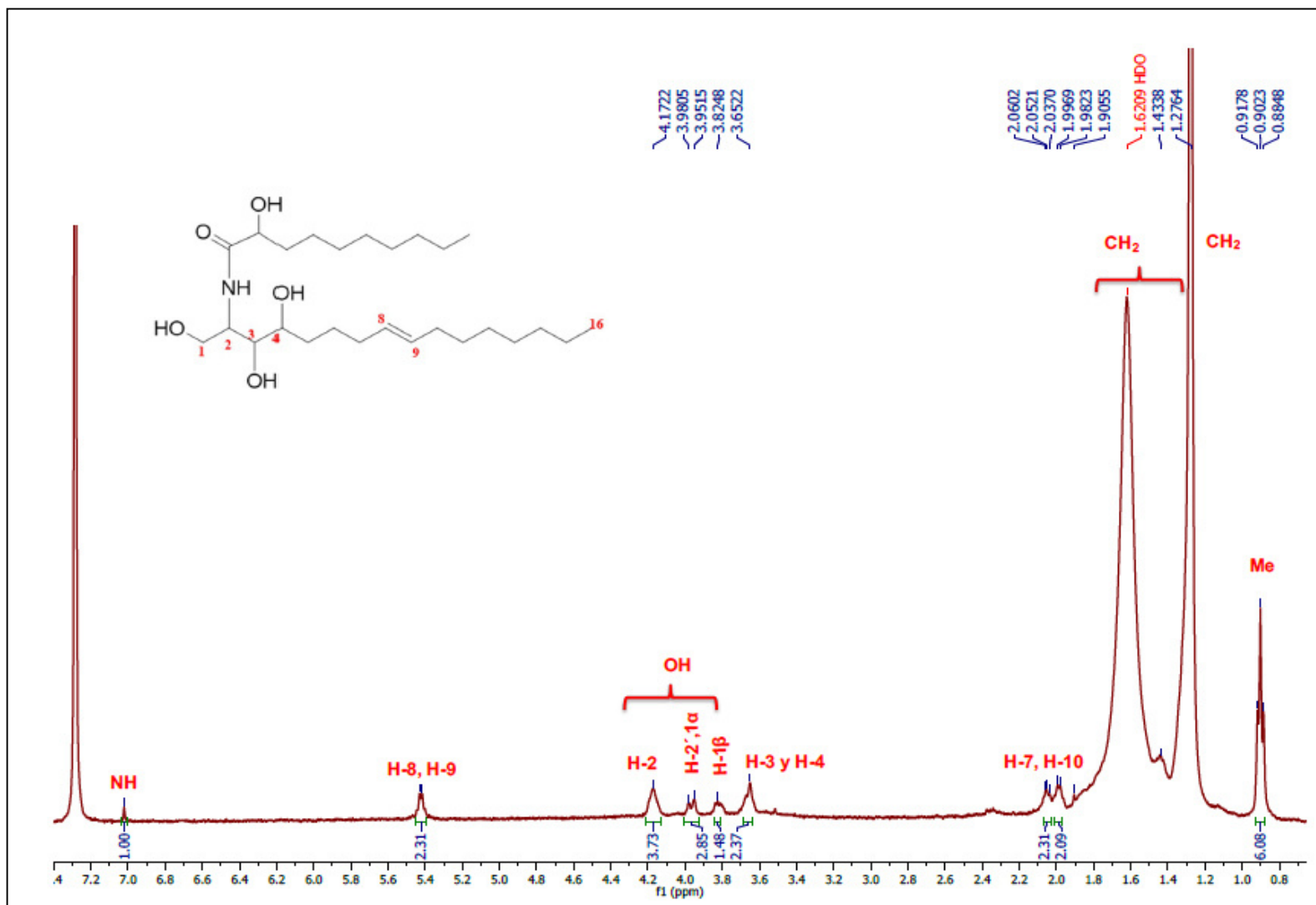


Figura 72. Espectro RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de 2-(2'-hidroxidecanoil amino)-1,3,4-hexadecanotriol-8-eno (CIH-15)

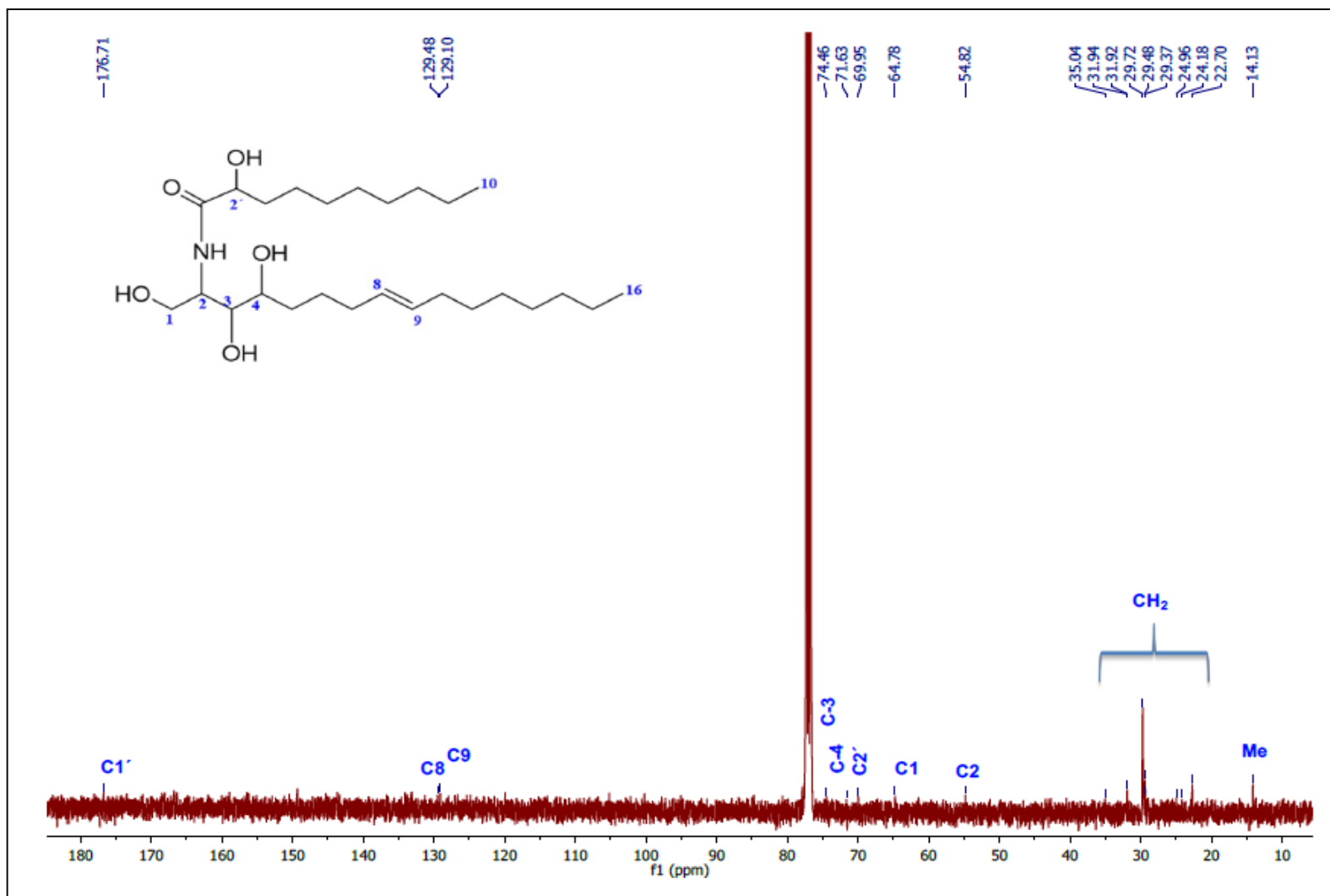


Figura 73. Espectro RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) de 2-(2'-hidroxidecanoil amino)-1,3,4-hexadecanotriol-8-eno (CIH-15)

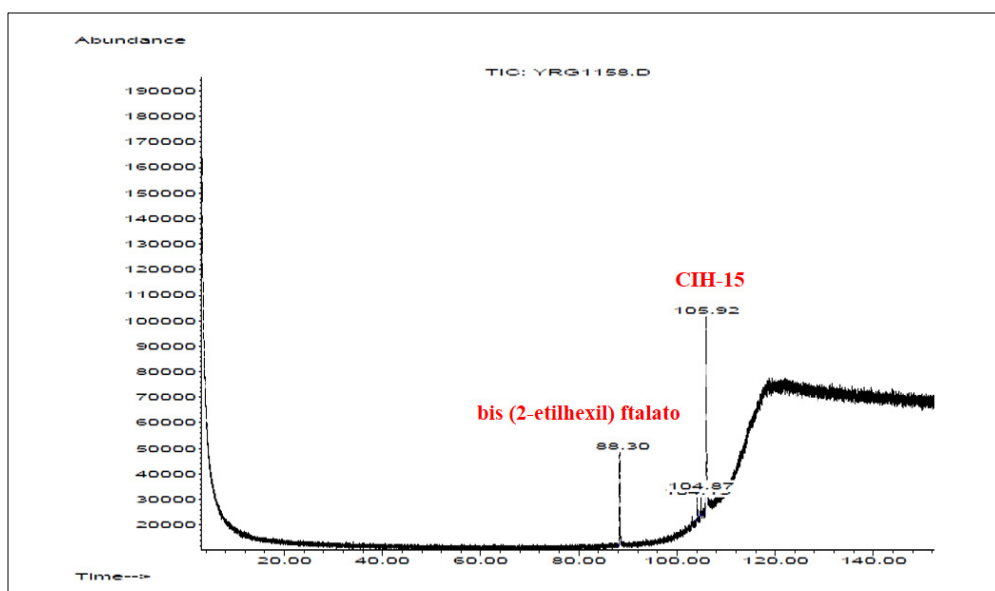


Figura 74. Cromatograma de Gases de **CIH-15**

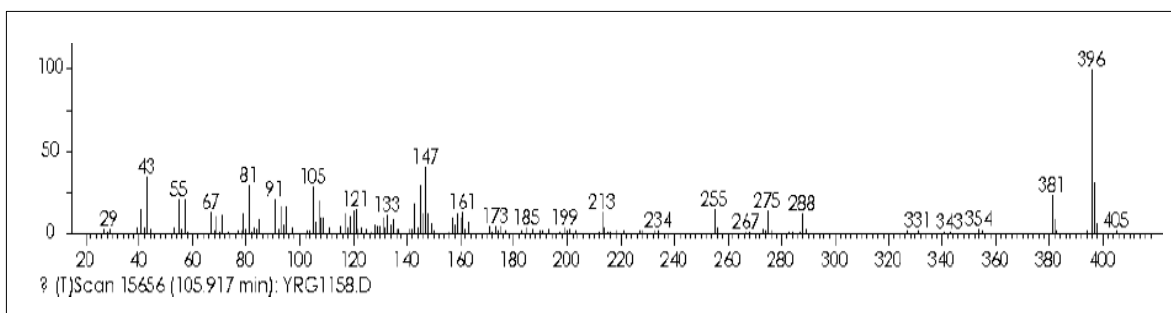


Figura 75. Espectro EM-IE de **CIH-15**

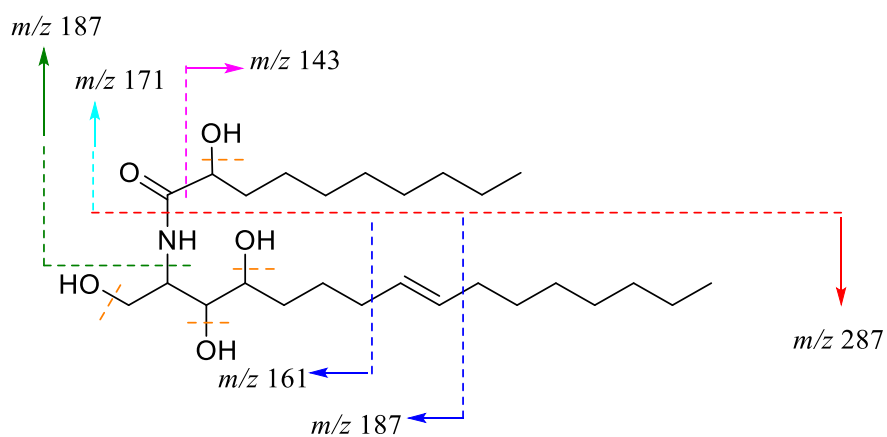


Figura 76. Fragmentaciones más importantes de **CIH-15**

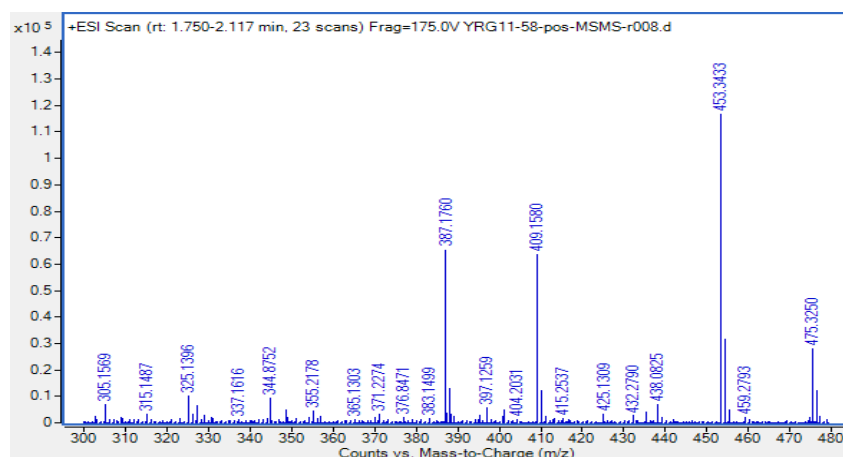


Figura 77. Espectro HRMS-ESI de **CIH-15**

Tabla 22. Datos espectroscópicos de RMN ^1H de ceramidas sintética y naturales

Posición	CIH-15	Análogo sintético ¹⁰⁵	Ceramida natural ¹⁰⁶
1	1 β -3.82 m	1 β -3.75 (dd, J =11.6, 5.6 Hz)	3.76 (dd, J =11.2, 4.6 Hz)
	1 α -3.97 m	1 α -3.91 (dd, J =11.6, 2.8 Hz)	3.78 (dd, J =11.2, 4.6 Hz)
2	4.17	4.14 m	4.13 m
3	3.65 m	3.54-3.67 m	3.55 m
4	3.65 m	3.54-3.67 m	3.54 m

Tabla 23. Comparación de datos espectroscópicos de **CIH-15** con ceramida natural

Posi ción	Datos obtenidos			
	RMN ^1H (CDCl ₃ , 600 MHz)	RMN ^{13}C (CDCl ₃ , 150 MHz)	RMN ^1H (CDCl ₃ , 400 MHz)	RMN ^{13}C (CDCl ₃ , 100 MHz)
1	3.76 (dd, J (Hz)=11.2, 4.6)	60.2	1 β -3.82 m	64.78
	3.78 (dd, J (Hz)=11.2, 4.6)		1 α -3.97 m	
2	4.13 m	50.9	4.17 m	54.82
3	3.55 m	74.5	3.65 m	74.46
4	3.54 m	71.4	3.65 m	71.63
7	2.03 m	31.8	2.05 m	31.94
8	5.41 (t, J (Hz)=3.4)	129.8	5.42 m	129.48
9	5.41 (t, J (Hz)=3.4)	129.3	5.42 m	129.10
10	1.98 m	31.8	1.99 m	31.92
CH ₂	1.26-1.31 sa	21.8, 24.2,	1.28 sa 1.62 m	22.70, 24.18,
		25.5, 28.4-		24.96, 29.37-
		28.9, 31.1		29.72
Me	0.88 (t, J (Hz)=6.9)	12.8	0.90 (t, J (Hz)=6.7)	14.13
1'	-	175.0	-	176.71
2'	4.04 (dd, J (Hz)=7.8, 3.8)	71.1	3.97 m	69.95
NH	ND*	-	7.02 m	-

*ND: No fue determinado en el artículo de referencia

5.1.2.14 Propiedades físicas y espectroscópicas de 2-(2'-acetoxidecanoil amino)-1,3,4-hexadecanotriacetat-8-eno (CIH-15Ac)

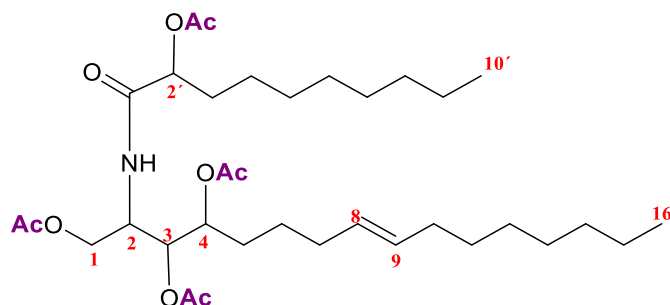


Figura 78. Estructura de 2-(2'-acetoxidecanoil amino)-1,3,4-hexadecanotriacetat-8-eno (CIH-15Ac)

El compuesto es una resina incolora, soluble en CHCl_3 , $\text{C}_{34}\text{H}_{59}\text{NO}_9$, $\text{PM}_{\text{calc.}}$ 625.42 g/mol, (estructura mostrada en la Figura 78). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.88 (t, $J=6.44$ Hz, 6H, Me), 1.25 (sa, CH_2), 1.67 (m, 4H, H-5, H-6), 1.82 (m, 2H, H-3'), 1.95 (m, 2H, H-7), 2.03 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-1}$), 2.06 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-4}$), 2.09 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-3}$), 2.18 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-2'}$), 4.01 (dd, $J=11.72$ Hz; 2.12 Hz, 1H, H-1 β), 4.36 (dd, $J=11.52$ Hz, 6.18 Hz, 1H, H-1 α), 4.45 (m, 1H, H-2), 4.95 (da, $J=9.72$ Hz, 1H, H-4), 5.10 (m, 2H, H-2' y H-3), 5.37 (m, 2H, H-8 y H-9), 6.60 (d, $J=9.04$ Hz, 1H, NH). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 14.13 (Me), 20.70 ($\text{CH}_3\text{CO-1}$), 20.76 ($\text{CH}_3\text{CO-4}$), 20.89 ($\text{CH}_3\text{CO-3}$), 21.04 ($\text{CH}_3\text{CO-2'}$), 22.71 (CH_2), 24.91 (CH_2), 25.53 (CH_2), 28.61 (C5), 29.25 (CH_2), 29.38 (CH_2), 29.45 (CH_2), 29.57 (CH_2), 29.60 (CH_2), 29.63 (CH_2), 29.68 (CH_2), 29.73 (CH_2), 31.80 (CH_2), 31.94 (C3'), 32.21 (C10), 32.62 (C7), 47.86 (C2), 62.35 (C1), 72.30 (C-2'), 74.02 (C3), 72.70 (C4), 129.29 (C9), 131.20 (C8), 170.04 (C1'), 170.90 ($\text{CH}_3\text{CO-4}$), 170.98 ($\text{CH}_3\text{CO-1}$), 171.31 ($\text{CH}_3\text{CO-2'}$, $\text{CH}_3\text{CO-3}$).

5.1.2.14.1 Elucidación estructural de 2-(2'-acetoxidecanoil amino)-1,3,4-

hexadecanotriacetat-8-eno (CIH-15Ac)

Se llevó a cabo la acetilación de la ceramida CIH-15, obteniéndose el correspondiente derivado acetilado, el cual fue analizado por RMN 1D y 2D. En RMN ^1H (Figura 79), se encontraron las señales indicativas de las ceramidas: una señal a campo alto correspondiente a los metilos terminales en δ 0.88, a continuación, una señal ancha correspondiente a las cadenas alifáticas largas (δ 1.25), un metino unido a nitrógeno (δ 4.45), por último, el protón de la amida secundaria en 6.60 ppm ($J=9.04$ Hz) respaldado por la señal de su carbonilo en 170.04 (C1') (Figura 81). Adicionalmente, en la región comprendida entre δ_{H} 4 y 5.1 ppm, encontramos a los hidrógenos base de los grupos ésteres (H-1 β , H-1 α , H-2', H-3, H-4). Al igual que en el producto natural, el derivado acetilado presentó señales propias de un doble enlace: δ_{H} 5.37 (H-8 y H-9); δ 129.29 (C9) y δ 131.20 (C8), sustentado por sus respectivas correlaciones en HSQC (Figura 82). El doble enlace se ubicó en la posición 8 de la LCB por consideraciones biogénicas¹⁰¹ y está sustentado por la correlación COSY (Figura 80) entre los protones H-7/H-8 (δ_{H} 1.95/ (δ_{H} 5.37) y la correlación HMBC (Figura 83) entre H-7/C9 (δ_{H} 1.95/ δ_{C} 129.29). No obstante, se recomienda realizar una derivatización con disulfuro de metilo¹⁰⁹ para comprobar esta posición. La geometría de este enlace se determinó que fuera *trans*, de acuerdo a los desplazamientos químicos de los carbonos adyacentes a C=C. Siendo reportado en la literatura que los isómeros (*E*) aparecen alrededor de 32 ppm, mientras que los (*Z*) en 27 ppm.¹⁰⁷ El esqueleto de la ceramida fue asignado utilizando el experimento HSQC al observar las correlaciones directas de protones con sus respectivos carbonos (H-1/C1), (H-2/C2), (H-3/C3), (H-4/C4), y en la parte del ácido graso H-2'/C2',

de esta forma quedaron comprobadas las asignaciones realizadas en el producto natural. La presencia de una LCB 1,3,4-triacetilada se dedujo de los datos del espectro de COSY (Figura 80). De esta forma, la señal en δ_H 6.60 (NH), dió un pico cruzado con la señal en δ_H 4.45 (H-2) que, a su vez, mostró picos cruzados con protones de metileno (H-1) en δ_H 4.36 y δ_H 4.01 y con H-3 en δ_H 5.10. Este último se correlacionó con la señal a δ_H 4.95 perteneciente a H-4. La unión de la LCB al ácido graso se confirmó por la correlación HMBC entre H-1 α y C1' (δ_H 4.36 y δ_C 170.04) (Figura 83).

Se ha reportado en la literatura que la configuración absoluta de C2, C3, C4 y C2' en todos los esfingolípidos aislados de plantas naturales es 2*S*, 3*S*, 4*R*, 2'*R*. La configuración anterior no pudo proponerse para este derivado aunque los desplazamientos químicos resultaran similares a los de otro esfingolípido previamente descrito¹⁰⁸, (Tabla 24) ya que no se pudo observar con claridad la multiplicidad y las constantes de acoplamiento de cada uno de los hidrógenos base de acetato. Los cuatro grupos hidroxilo del producto natural quedaron confirmados por la acetilación y por los espectros de 1H y ^{13}C de su derivado tetraacetilado. Se observaron cuatro singuletes de grupos acetilos en δ_H (ppm): 2.03 ($\underline{CH_3CO}$ -1), 2.06 ($\underline{CH_3CO}$ -4), 2.09 ($\underline{CH_3CO}$ -3), 2.18 ($\underline{CH_3CO}$ -2'), cuatro metilos unidos al grupo carbonilo del éster en δ_C (ppm): 20.70 ($\underline{CH_3CO}$ -1), 20.76 ($\underline{CH_3CO}$ -4), 20.89 ($\underline{CH_3CO}$ -3), 21.04 ($\underline{CH_3CO}$ -2'), y cuatro carbonilos de éster en δ_C (ppm): 170.90 ($\underline{CH_3CO}$ -4), 170.98 ($\underline{CH_3CO}$ -1), 171.31 ($\underline{CH_3CO}$ -2', $\underline{CH_3CO}$ -3). Con base en la evidencia anterior, se demuestra que CIH-15Ac es el derivado acetilado de CIH-15, y se estableció como: 2-(2'-acetoxidecanoil amino)-1,3,4-hexadecanotriacetat-8-eno. Al igual que para su producto natural, no se tienen reportes en la literatura de este derivado, siendo este trabajo, su primera caracterización.

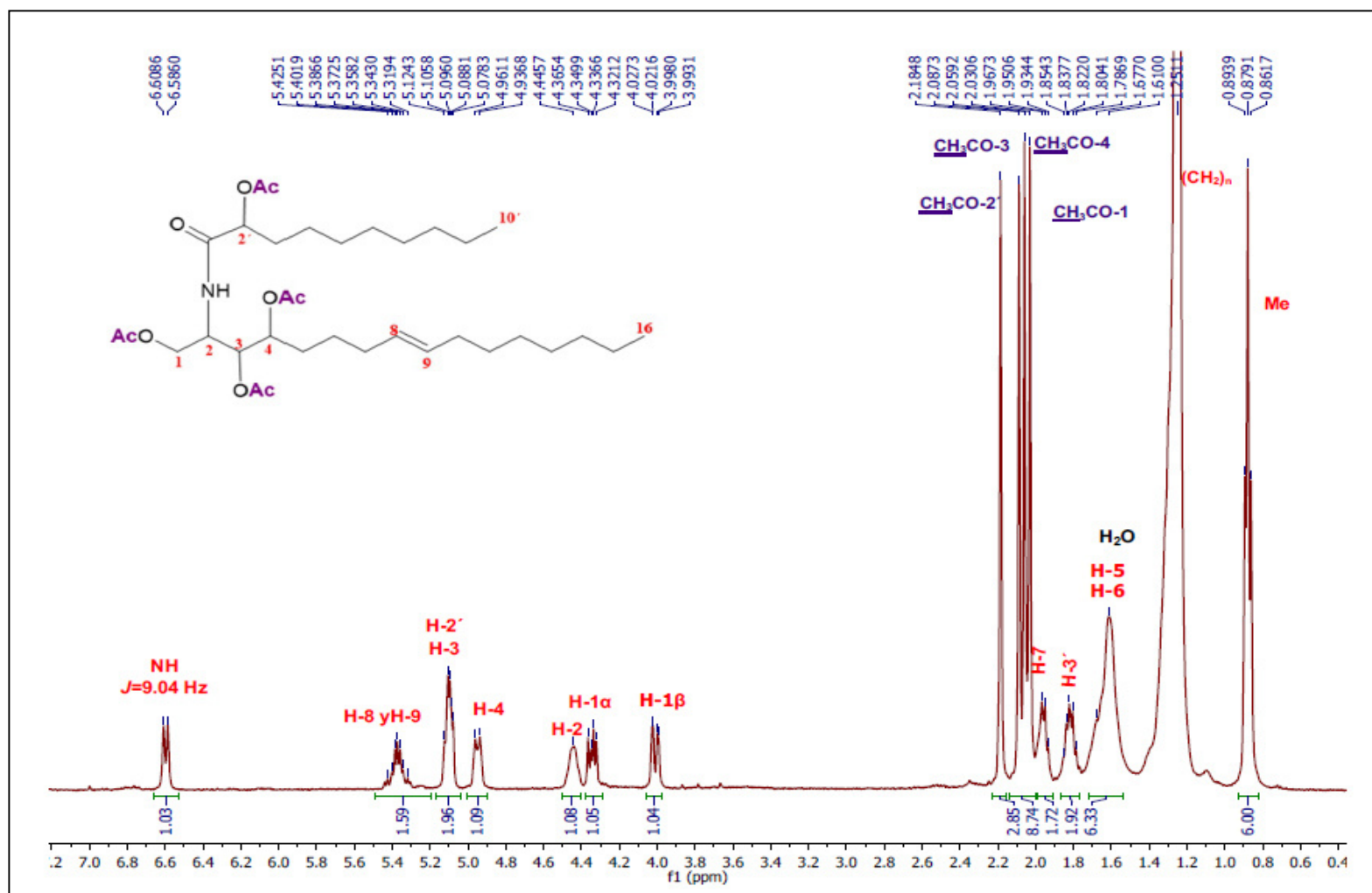


Figura 79. Espectro RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de 2-(2'-acetoxidecanoil amino)-1,3,4-hexadecanotriacetat-8-eno (**CIH-15Ac**)

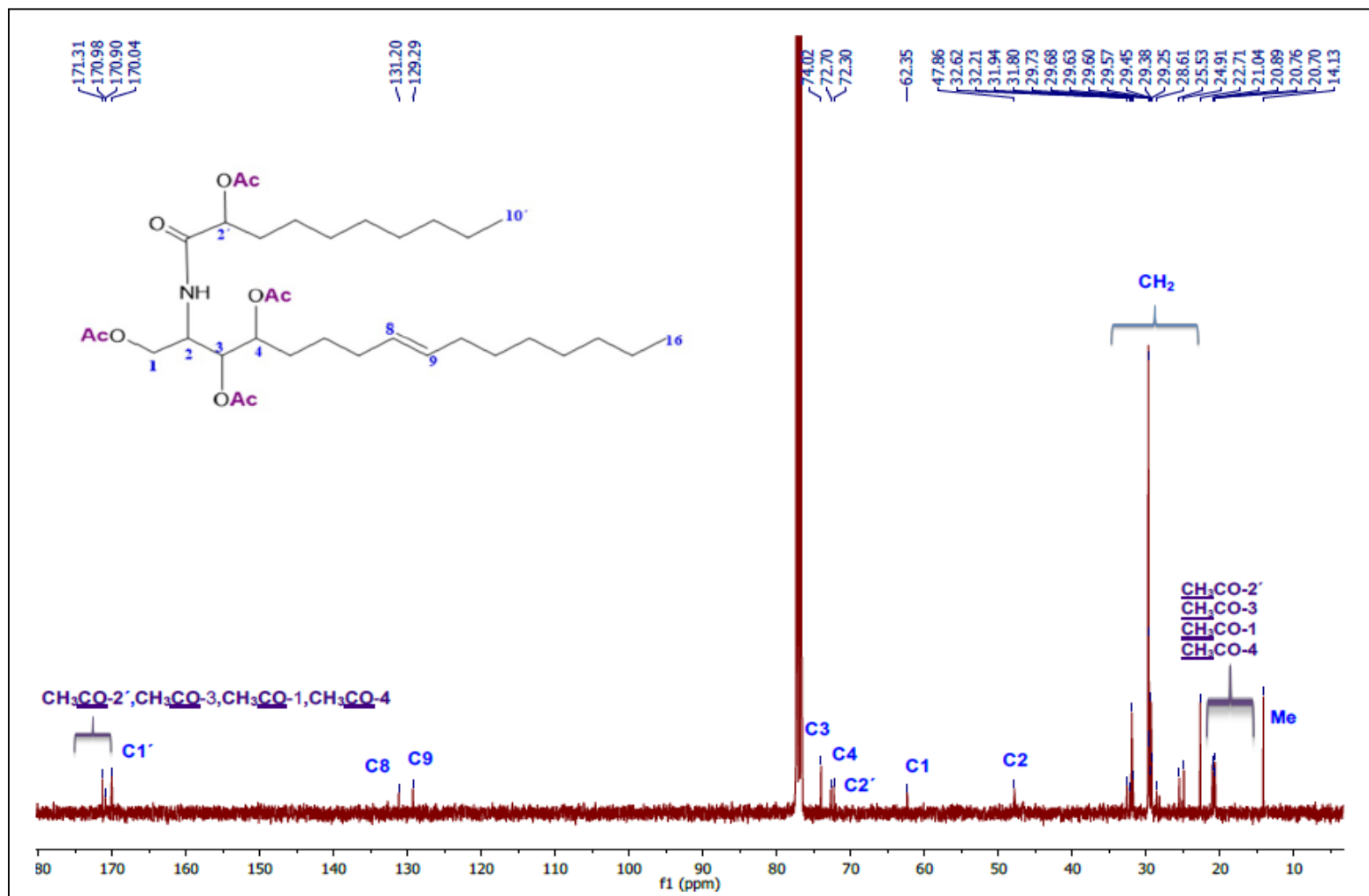


Figura 81. Espectro RMN ^{13}C (100 MHz CDCl_3) de 2-(2'-acetoxidecanoil amino)-1,3,4-hexadecanotriacetat-8-eno (**15Ac**)

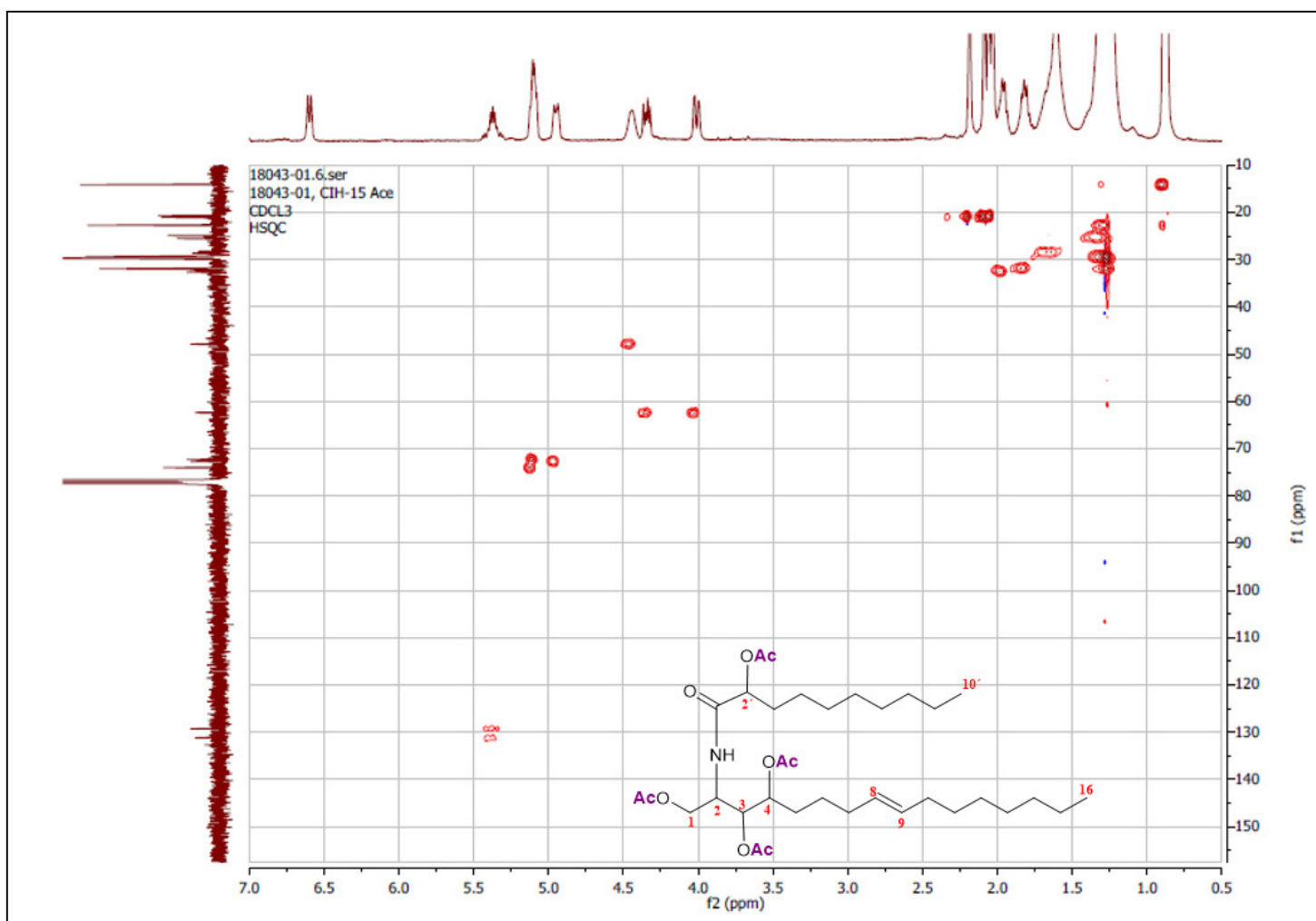


Figura 82. Espectro HSQC de 2-(2'-acetoxidecanoil amino)-1,3,4-hexadecanotriacetat-8-eno (CIH-15Ac)

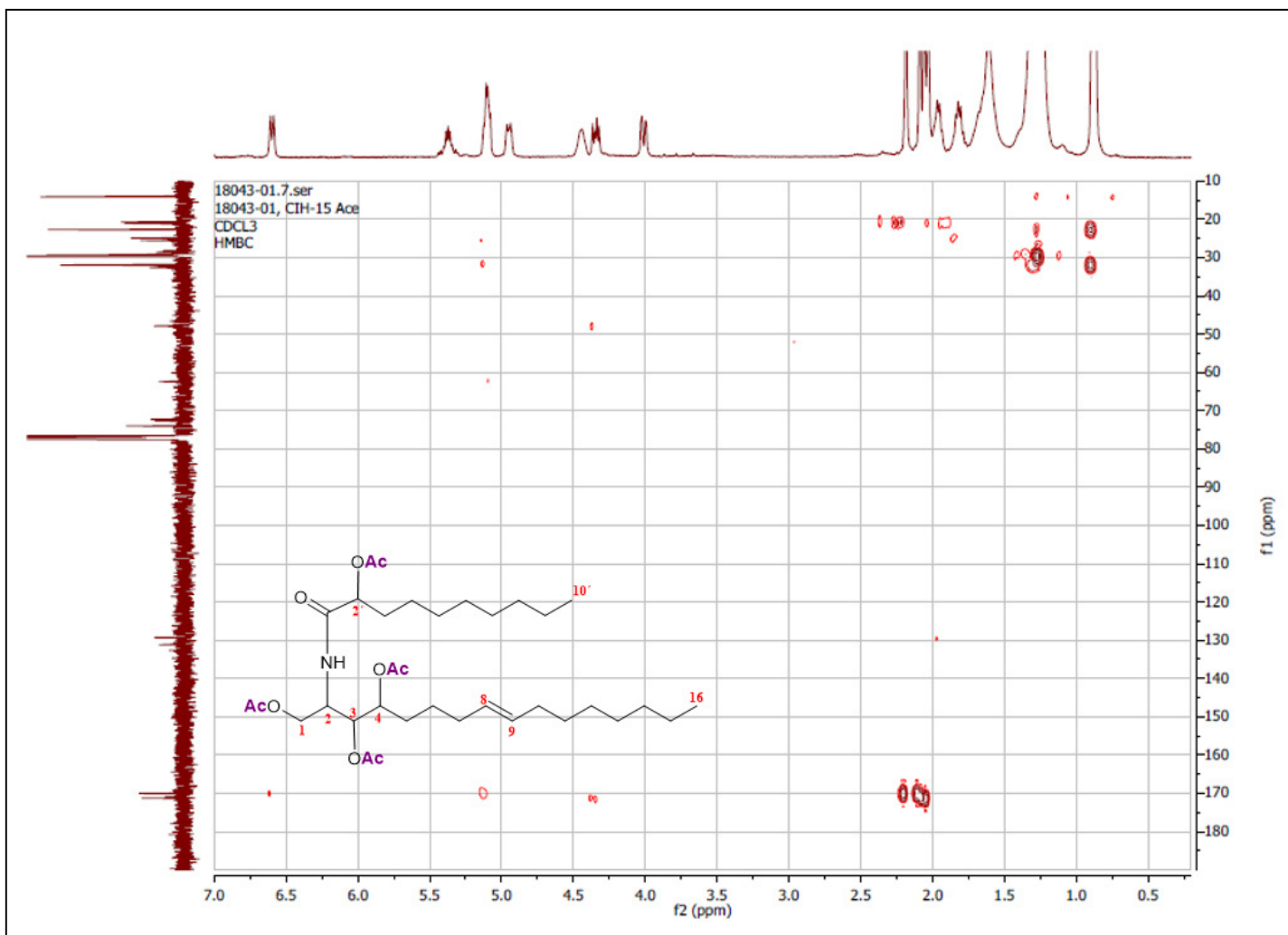


Figura 83. Espectro HMBC de 2-(2'-acetoxidecanoil amino)-1,3,4-hexadecanotriacetat-8-eno (CIH-15Ac)

Tabla 24. Comparación de datos espectroscópicos de **CIH-15Ac** con análogo acetilado

Posición	Referencia ¹⁰⁸		Datos obtenidos	
	RMN ¹ H (CDCl ₃ 400 MHz)	RMN ¹³ C (CDCl ₃ 100 MHz)	RMN ¹ H (CDCl ₃ 400 MHz)	RMN ¹³ C (CDCl ₃ 100 MHz)
1	1 α -4.34 (dd, <i>J</i> (Hz)= 6.4, 11.9) 1 β -4.01 (dd, <i>J</i> (Hz)= 3.0, 11.9)	62.30	1 α -4.36 (dd, <i>J</i> (Hz)= 11.52; 6.18) 1 β -4.01 (dd, <i>J</i> (Hz)= 11.72, 2.12)	62.35
2	4.45 m	47.90	4.45 m	47.86
3	5.10 m	74.00	5.10 m	74.02
4	5.09 m	72.60	4.95 (da, <i>J</i> (Hz)= 9.72)	72.70
7	1.95 m	32.60	1.95 m	32.62
8	5.36 (dt, <i>J</i> (Hz)= 5.4, 15.6)	131.20	5.37 m	131.20
9	5.39 (dt, <i>J</i> (Hz)= 5.6, 15.6)	129.30	5.37 m	129.29
10	1.95 m	32.20	1.25 sa	32.21
CH ₂	1.25 sa	29.2-29.7	1.25 sa	22.71, 24.91, 25.53, 29.25-31.80
Me	0.88 (t, <i>J</i> (Hz)=6.8)	14.10	0.88 (t, <i>J</i> (Hz)=6.44)	14.13
NH	6.63 (d, <i>J</i> (Hz)=9.2)	-	6.60 (d, <i>J</i> (Hz)=9.04)	-
1'	-	NR	-	170.04
2'	4.95 (da, <i>J</i> (Hz)=6.4)	72.70	5.10 m	72.30
3'	1.80 m	31.90	1.82 m	31.94
<u>CH</u> ₃ CO-1	2.03 s	20.60	2.03 s	20.70
<u>CH</u> ₃ CO-3	2.09 s	20.80	2.09 s	20.89
<u>CH</u> ₃ CO-4	2.06 s	20.70	2.06 s	20.76
<u>CH</u> ₃ CO-2'	2.18 s	21.00	2.18 s	21.04
CH ₃ <u>CO</u> -1	-	170.00	-	170.98
CH ₃ <u>CO</u> -3	-	170.90	-	171.31
CH ₃ <u>CO</u> -4	-	170.00	-	170.90
CH ₃ <u>CO</u> -2'	-	171.30	-	171.31

NR: No Reportado en el artículo de referencia

5.1.2.15 Propiedades físicas y espectroscópicas de CIH-10

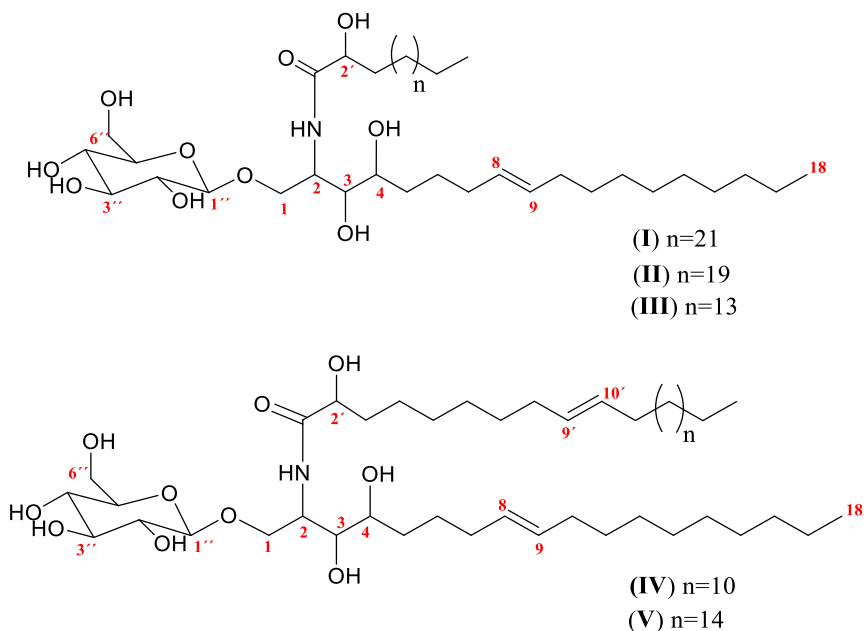


Figura 84. Estructuras químicas de los compuestos identificados en CIH-10

Sólido color pardo, soluble en piridina y DMSO, pf 190-192°C, IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} : 3260, 2980, 2875, 1625, 1540, 1490, 1400, 1100, 1080, 740. HRMS-ESI (modo de ionización positiva) m/z : 872 $[M+H]^+$, 844 $[M+H]^+$, 759 $[M]^+$, 810 $[M+H_2O-H]^+$ y 883 $[M]^+$. UPLC-QToF-MS m/z : 871.7200 $[M]^+$ ($\text{C}_{50}\text{H}_{97}\text{NO}_{10}$, calc. 871.7112), 843.6866 $[M]^+$ ($\text{C}_{48}\text{H}_{93}\text{NO}_{10}$, calc. 843.6799), 759.6281 $[M]^+$ ($\text{C}_{42}\text{H}_{81}\text{NO}_{10}$, calc. 759.5860), 827.6047 $[M]^+$ ($\text{C}_{47}\text{H}_{89}\text{NO}_{10}$, calc. 827.6486) y 883.6487 $[M]^+$ ($\text{C}_{51}\text{H}_{97}\text{NO}_{10}$, calc. 883.7112), (estructuras mostradas en Figura 84). RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 0.86 (t, $J=6.62$ Hz, Me), 1.24 (CH_2), 1.48 (m, H-3'), (1.50m, H-5), 1.96 (m, H-7, H-10), 2.93 (ddd, $J=8.28$ Hz, $J=12.10$ Hz, $J=8.5$ Hz, H-2''), 3.33 (m, H-4), 3.09 (m, H-4'', H-5'', H-3''), 3.43 (m, H-6'' β , H-3), 3.66 (m, H-6'' α , H-1 β), 3.83 (m, H-1 α , H-2'), 4.10 (m, H-2), 4.14 (d, $J=7.84$ Hz, H-1'), 4.36 (t, $J=6.46$ Hz, OH), 4.54 (t, $J=5.5$ Hz, OH), 4.79 (m,

OH), 4.96 (m, OH), 5.32 (m, H-8, H-9), 5.60 (d, $J=5.12$ Hz, OH), 7.55 (d, $J=9.4$ Hz, N-H). RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 14.41 (Me), 22.57 (CH_2), 24.85 (CH_2), 24.90 (CH_2), 26.10 (CH_2), 27.14 (C7), 27.43 (C10), 29.08 (CH_2), 29.17 (CH_2), 29.20 (CH_2), 29.46 (CH_2), 29.49 (CH_2), 29.54 (CH_2), 29.57 (CH_2), 29.66 (CH_2), 31.77 (CH_2), 32.52 (C5), 34.81 (C3'), 50.34 (C2), 61.51 (C6''), 69.42 (C1), 70.46 (C4''), 71.01 (C4), 71.39 (C2'), 73.92 (C2''), 74.64 (C3), 76.97 (C5''), 77.36 (C3''), 103.96 (C1'), 129.84 (C9), 130.18 (C8), 174.25 (C1').

5.1.2.15.1 Elucidación estructural de CIH-10

En el espectro IR (Figura 85) se observaron fuertes bandas de absorción indicativas de grupos hidroxilo (3260 cm^{-1} y 1080 cm^{-1}) y amida (3260 cm^{-1} y 1625 cm^{-1}), sugiriendo que CIH-10 era un derivado de amida hidroxilado.

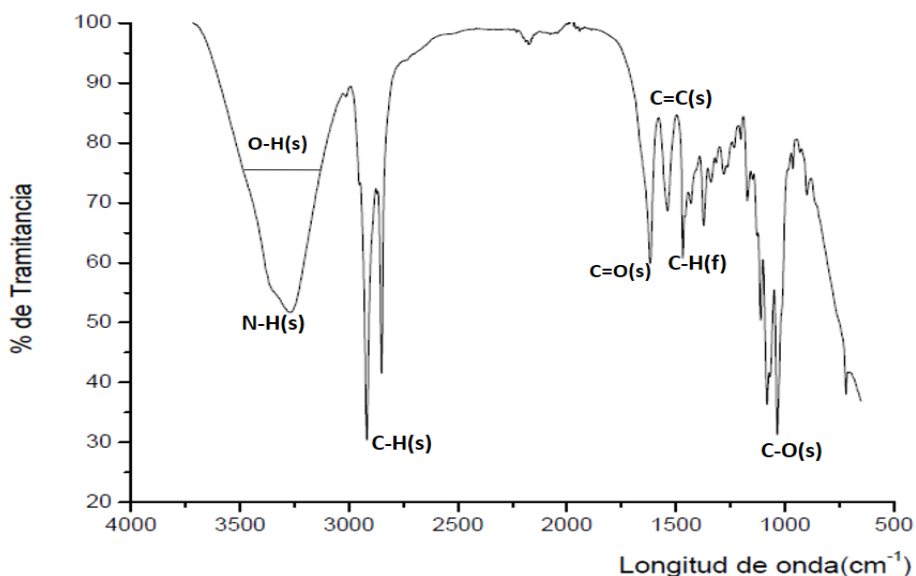


Figura 85. Espectro IR de **CIH-10**

Lo anterior estuvo respaldado por los espectros de RMN de H^1 y C^{13} (Figuras 86 y 88): la presencia de un protón unido a nitrógeno a δ_{H} 7.55 (d, $J=9.4$ Hz), carbono unido a nitrógeno a δ_{C} 50.34 y un carbonilo de amida a δ_{C} 174.25. El espectro H^1 también mostró

la presencia de múltiples señales de protones entre δ 1.25–1.96 y una señal triplete de protones en δ 0.86 ($J=6.62$ Hz), lo que justificó la presencia de cadenas alifáticas. Adicionalmente se distingue un resto de azúcar en la estructura de CIH-10, por la señal de protón anomérico a δ_H 4.14, carbono anomérico a δ_C 103.96, y cinco carbonos oxigenados a δ_C : 77.36, 76.97, 73.92, 70.46 y 61.51. Los espectros de H^1 y C^{13} también mostraron la presencia de protones olefínicos a δ 5.32 (H-8 y H-9) y de carbonos olefínicos a δ 130.18 y δ 129.84, atribuibles a un doble enlace disustituido. Con la ayuda de los experimentos 2D se pudo sugerir el esqueleto de CIH-10. Correlaciones 1H - 1H COSY (Figura 87) se establecieron entre los protones NH/H-2 (δ_H 7.55/ δ_H 4.10), H-1/H-2 (δ_H 3.83/ δ_H 4.10), H-2'/H-3' (δ_H 3.83/ δ_H 1.50), así como entre H-8 y H-9 con H-7 y H-10 (δ_H 5.32/ δ_H 1.96). Utilizando el experimento HSQC (Figura 89) se conectaron los protones con sus carbonos, pudiéndose establecer el número de hidroxilos. Por su parte, el espectro HMBC (Figura 90) evidenció la conexión entre el protón NH con el carbonilo C1' (δ_H 7.55/ δ_C 174.25). Los datos espectroscópicos obtenidos del esqueleto de CIH-10 concuerdan con los reportados por Lu *et al.*¹⁰⁷ indicando que CIH-10 es un glucosilcerebrósido (Tabla 25). Los glucosilcerebrósidos son uno de los esfingolípidos complejos informados en las plantas superiores, componentes de la membrana plasmática y el tonoplasto de las células vegetales. También se encuentran en ciertos tejidos de mamíferos como la piel. Por su parte, los galactocerebrósidos prevalecen en el cerebro y el sistema nervioso central, y rara vez se detecta o informa en las plantas.¹⁰⁴

CIH-10 fue analizado por UPLC-QToF-MS, el cromatograma obtenido (Figura 92) mostró una serie de picos a diferentes t_R indicando la presencia de una mezcla de compuestos homólogos. Los porcentajes de abundancia según el cromatograma fueron:

30% (**I**, t_R 0.34 min); 8% (**II**, t_R 0.78 min); 46% (**III**, t_R 1.61 min); 10% (**IV**, t_R 4.21 min); y 6% (**V**, t_R 7.19 min); siendo el **III** el más abundante. De esta forma, los espectros HRMS-ESI (modo de ionización positiva) mostraron los siguientes iones: m/z 872 $[M+H]^+$ (**I**), 844 $[M+H]^+$ (**II**), 759 $[M]^+$ (**III**), 810 $[M+H_2O-H]^+$ (**IV**), y 883 $[M]^+$ (**V**), los cuales se muestran en las Figuras 93, 94, 95, 96 y 97 (espectros numéricos en Apéndices). Para determinar la estructura completa de CIH-10, se le realizó una metanólisis¹⁰⁹, la cual proporcionó una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos, una base de cadena larga trihidroxilada (LCB) y un metilglucopiranosido (Figura 96). La mezcla de ésteres de ácidos grasos fue analizada por CG-EM, identificándose cinco compuestos: 2-hidroxiioctadecanoato de metilo (t_R 14.01 min), EM-IE m/z : 314 $[M]^+$, 298, 281, 267, 255, 207, 74 (PB), 55, 43, 32; 2-hidroxitricos-9-enoato de metilo (t_R 15.178 min), EM-IE m/z : 382 $[M]^+$, 341 $[M-(CH_3)-(CH=CH)]^+$, 282 $[341-CH_3OCO]^+$, 57 (PB), 41, 32; 2-hidroxitetracosanoato de metilo (t_R 16.281 min), EM-IE m/z : 398 $[M]^+$, 355 $[M-(CH_3)-(CH_2)_2]^+$, 341 $[355-(CH_2)]^+$, 327 $[341-(OH)]^+$, 283 $[327-COO]^+$, 57 (PB), 43; 2-hidroxihexacosanoato de metilo (t_R 16.287 min), EM-IE m/z 426 $[M]^+$, 268 $[M-(CH_3COO)-(CH_3)-(CH_2)_6]^+$, 250 $[M-OH]^+$, 82 (PB), 68, 55, 43; y 2-hidroxiheptacos-9-enoato de metilo (t_R 16.797 min), EM-IE m/z : 438 $[M]^+$, 355 $[438-(CH_3)-(CH_2)_3-(CH=CH)]^+$, 341 $[355-(CH_2)]^+$, 326 $[341-(CH_3)]^+$, 281 $[326-COOH]^+$, 82 (PB), 57, 43. La variabilidad en cuanto a las estructuras de los ácidos grasos obtenidos coinciden con lo expuesto en trabajos anteriores. Las principales modificaciones para las VLCFA en plantas son la α -hidroxilación (ó su ausencia), la longitud variable y la desaturación en la posición ω -9.^{101,104} La configuración de C-2' no se pudo determinar aunque su desplazamiento químico (δ 72.23) fue muy similar al dato reportado de un esfingolípido sintético¹⁰⁵ y otros esfingolípidos naturales.^{106,109,112} La medición de la rotación óptica de

la mezcla de ésteres de ácidos grasos hubiese sido recomendable para confirmar esta propuesta, lo cual no pudo realizarse por no obtener suficiente muestra de la reacción.

En cuanto a la LCB obtenida por la metanólisis, la misma fue acetilada y posteriormente analizada por UPLC-QToF-MS. El cromatograma mostró un pico a t_R 0.369 min cuyo espectro de masas reveló un m/z 442.2977 $[M+1]^+$, y fragmentos característicos a m/z 302, 178, 138, 96 que indicaron que la estructura de este derivado sería 1,3,4-triacetoxi-2-amino-octadec-8-eno (Ver en Apéndices), comprobándose la LCB de 18 carbonos 1,3,4-trihidroxilada propuesta. La longitud de la LCB, así como el número de hidroxilos también se confirmaron en los espectros de HRMS-ESI de CIH-10 por el ion m/z 341 (obtenido por la ruptura α al carbonilo y la pérdida de glucosa) (Figuras 93 a la 97). A partir de este fragmento, se obtienen los iones m/z 338 (PB para **I**, **II**, **III**) y luego los iones m/z 321 y 303 por las pérdidas de los OH (ver esquemas de fragmentación en las Figuras 93, 94 y 95). Para **IV** y **V**, se confirmaron tanto la LCB como la VCLFA por las pérdidas de la glucosa, obteniéndose respectivamente sus PB (Figuras 96 y 97). Otras fragmentaciones importantes para **IV** y **V** también son indicadas en dichas figuras.

Por su parte, la posición del doble enlace en la LCB se determinó en base al origen biogénico, siendo la insaturación en el C8 la más abundante dentro de los esfingolípidos de las plantas.¹⁰¹ Lo anterior está respaldado por la presencia del ion m/z 153 en los espectros HRMS-ESI de **I-V** (Figuras 93 a la 97, espectros numéricos en Apéndices), y por la fuerte correlación COSY observada entre los protones H-7/H-10 (δ_H 1.96) con H-8/H-9 (δ_H 5.32). De igual forma, las correlaciones HMBC entre H-7/H-10 con C8/C9, confirmaron esta posición en la LCB (Figura 90). Se determinó que el doble enlace era geometría Z por los desplazamientos químicos de los carbonos alílicos adyacentes al doble enlace en δ_C 27.14 (C7) y δ_C 27.43 (C10).¹¹⁰ Este hecho coincide totalmente con la

literatura ya que el doble enlace en Δ^8 puede estar presente tanto en *cis* como en *trans*, y la proporción de estos isómeros varía según las especies, siendo exclusiva su presencia en el reino vegetal.¹⁰¹ De hecho, se han aislado y caracterizado cerebrósidos *cis* y *trans* provenientes de diferentes fuentes naturales.¹¹¹ Adicionalmente, la derivatización de la doble ligadura, utilizando disulfuro de dimetilo podría recomendarse para confirmar la posición del doble enlace.¹⁰⁹

Se ha referido anteriormente que las configuraciones absolutas de C-2, C-3, C-4 en todos los esfingolípidos aislados de plantas naturales son (2*S*, 3*S*, 4*R*)¹⁰⁷. En este sentido, se compararon los desplazamientos químicos de los protones H-2 (δ 5.25) y los de los carbonos C-1 (δ 72.23), C-2 (δ 51.50), C-3 (δ 71.21), C-4 (δ 72.18), C-1' (δ 175.39) de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C (piridina) de CIH-10 con los reportados para los cerebrósidos de *Euphorbia sororia*¹⁰⁹, *Serratula chinensis*¹¹², *Cordia platythyrsa*¹⁰⁶, así como para una ceramida sintetizada¹⁰⁵ (Tabla 26); existiendo concordancia entre ellos. Sin embargo, la falta de la medición de la rotación óptica de la LCB, incidió para no proponer las configuraciones anteriores, aunado al hecho de que CIH-10 es una mezcla de cerebrósidos. Como se mencionó anteriormente, el protón anomérico en δ 4.14 y los seis átomos de carbono oxigenados a δ : 103.96, 73.92, 77.36, 70.46, 76.97, 61.51 en ^{13}C sugirieron la presencia de un glucopiranósido. Lo anterior quedó confirmado al analizar por HRMS-ESI (modo negativo) a la glucosa metilada obtenida de la metanólisis de CIH-10. La presencia de m/z 194 $[M]^-$ plenamente justificó al metilglucopiranósido (ver en el Apéndice). Se confirma que el monosacárido es la glucosa por las constantes de acoplamiento $J_{4-5}=8.64$ Hz y $J_{4-3}=9.04$ Hz, evidenciando el acoplamiento axial-axial para

H-4''. La configuración β también se corroboró por $J=7.84$ Hz de H-1'', consistente con el acoplamiento esperado axial-axial para el anómero β de la glucosa.

El enlace de las tres partes de CIH-10 se comprobó mediante el experimento NOESY (Figura 91). En dicho espectro la señal del protón de la amida δ_H 7.55 se correlacionó con las señales de los protones H-2' (δ 3.83) del ácido graso, así como con H-1 β (δ 3.66) y H-2 (δ 4.10) de la LCB. También se observó la correlación entre las señales de H-1 α /1 β (δ 3.83/3.66) de la LCB y la señal de protón anomérico de la glucosa (H-1'', δ 4.14). Cabe mencionarse el hecho de que al ser CIH-10 una mezcla, las integraciones mostradas en RMN 1H no concuerdan con la totalidad de protones, no obstante, resultan útiles en la interpretación de los espectros.

Por todas las evidencias y discusión anteriores, CIH-10 se determinó como la mezcla de cinco cerebrósidos: 1-*O*- β -glucopiranosil-2-(2'-hidroxihexacosanoil amino)-1,3,4-octadecanotriol-8-eno (**I**); 1-*O*- β -glucopiranosil-2-(2'-hidroxitetracosanoil amino)-1,3,4-octadecanotriol-8-eno (**II**); 1-*O*- β -glucopiranosil-2-(2'-hidroxioctadecanoil amino)-1,3,4-octadecanotriol-8-eno (**III**); 1-*O*- β -glucopiranosil-2-(2'-hidroxitricos-9-enoil amino)-1,3,4-octadecanotriol-8-eno (**IV**); 1-*O*- β -glucopiranosil-2-(2'-hidroxiheptacos-9-enoil amino)-1,3,4-octadecanotriol-8-eno (**V**). Es la primera caracterización de **IV** y **V** en la literatura. Adicionalmente es el primer reporte de todos cerebrósidos (**I-IV**) en el género *Cissus*.

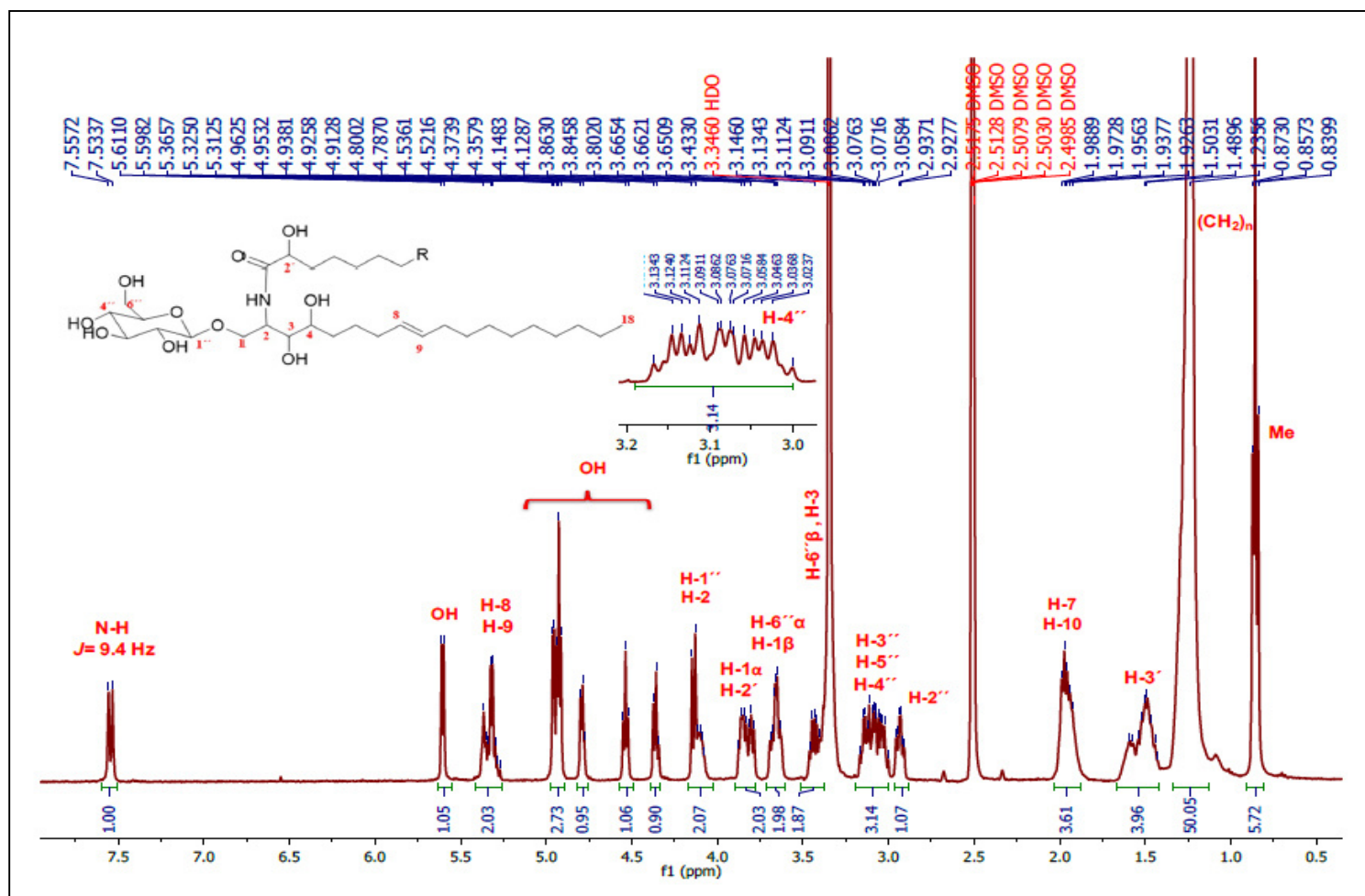


Figura 86. Espectro RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) de CIH-10

*Estructura general de cerebrósidos caracterizados en CIH-10

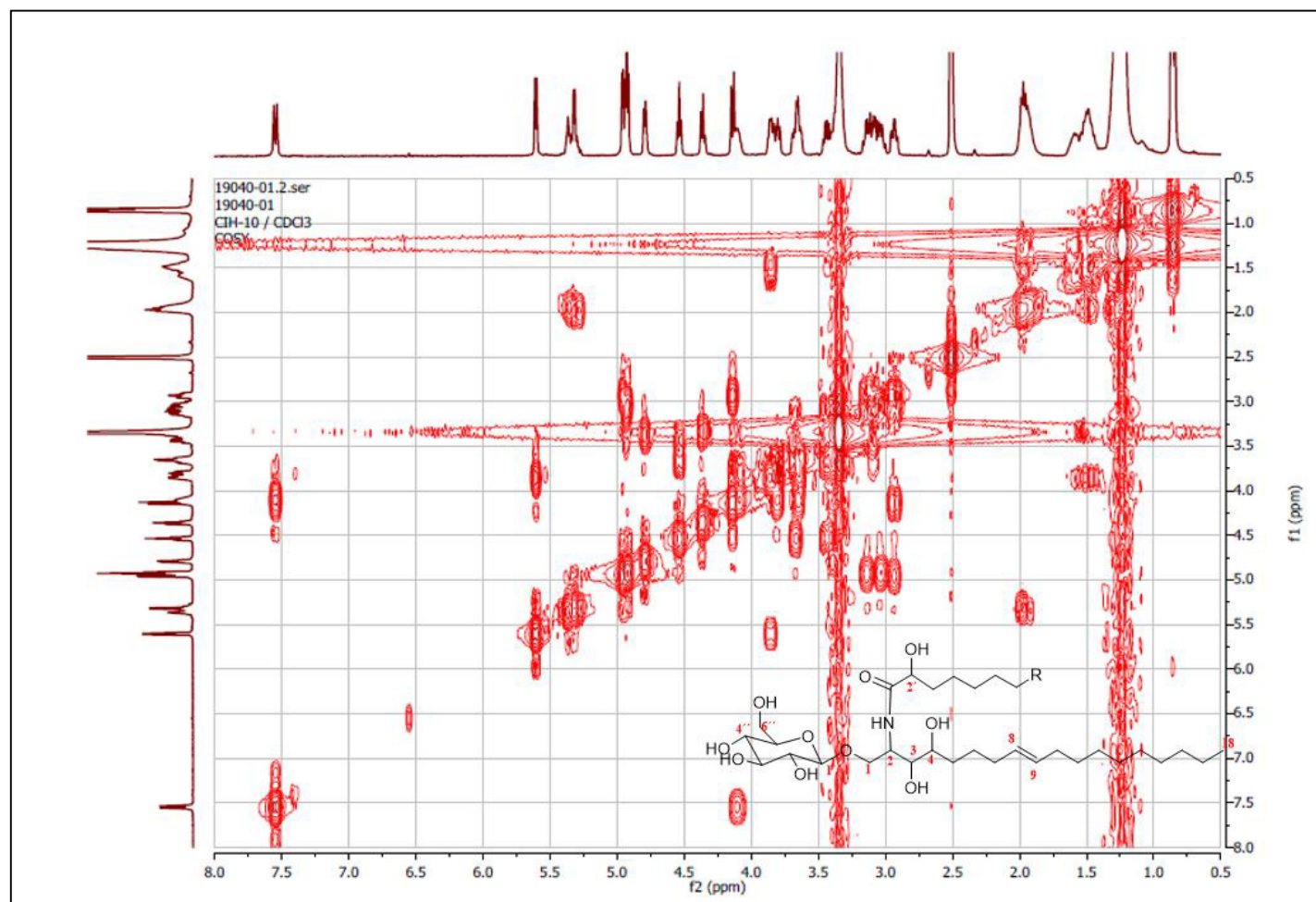


Figura 87. Espectro COSY de CIH-10

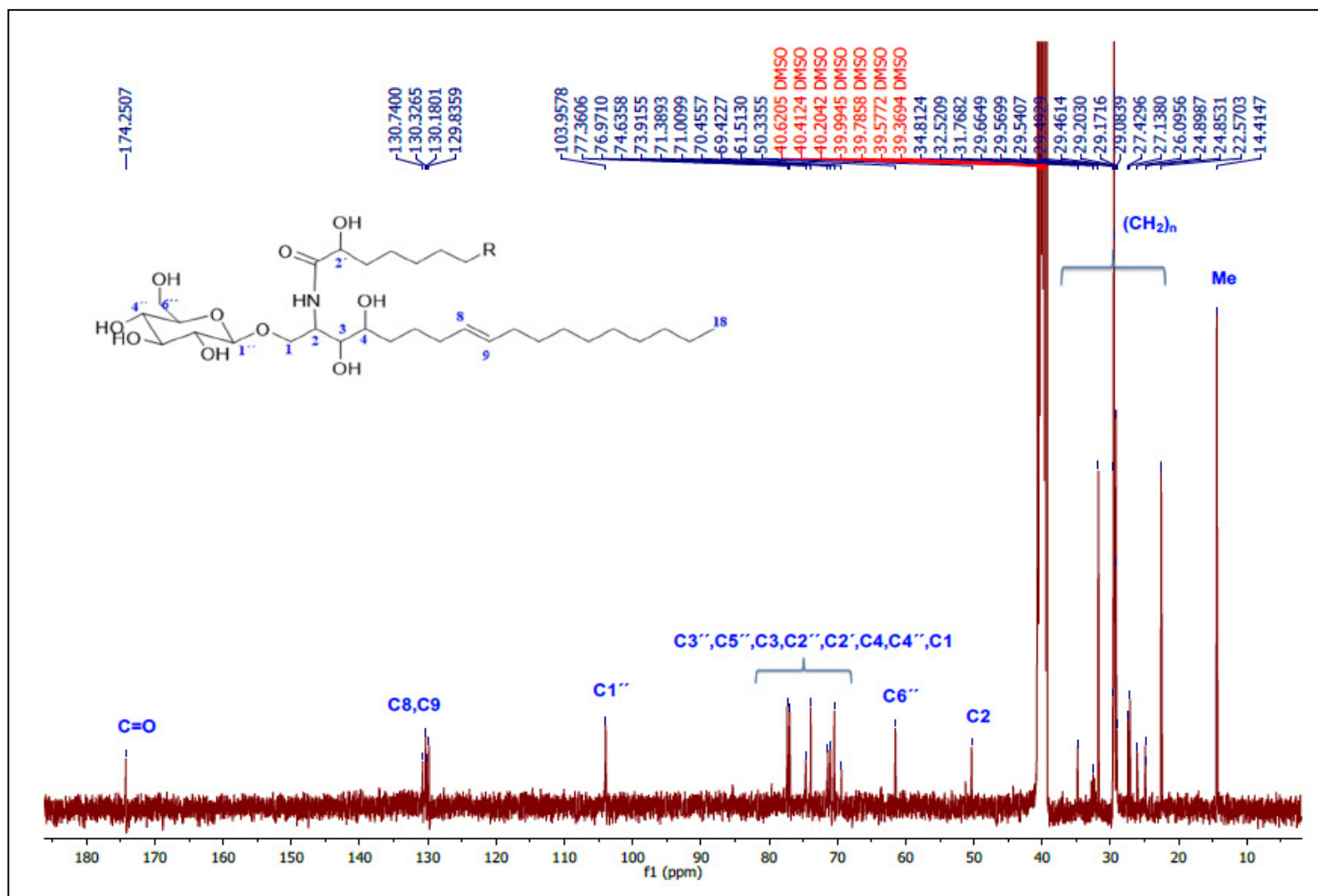


Figura 88. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO-*d*6) de **CIH-10**

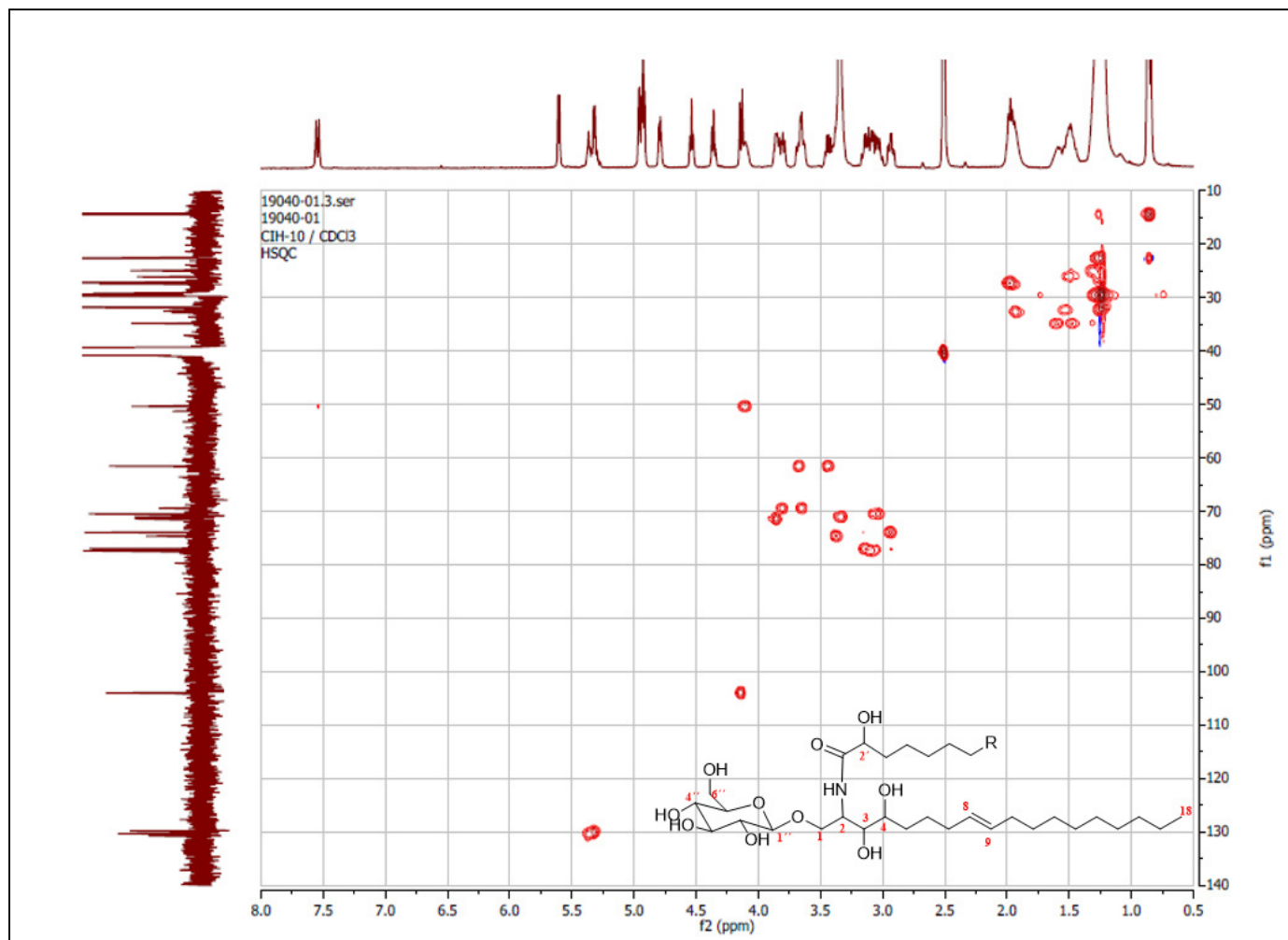


Figura 89. Espectro HSQC de **CIH-10**

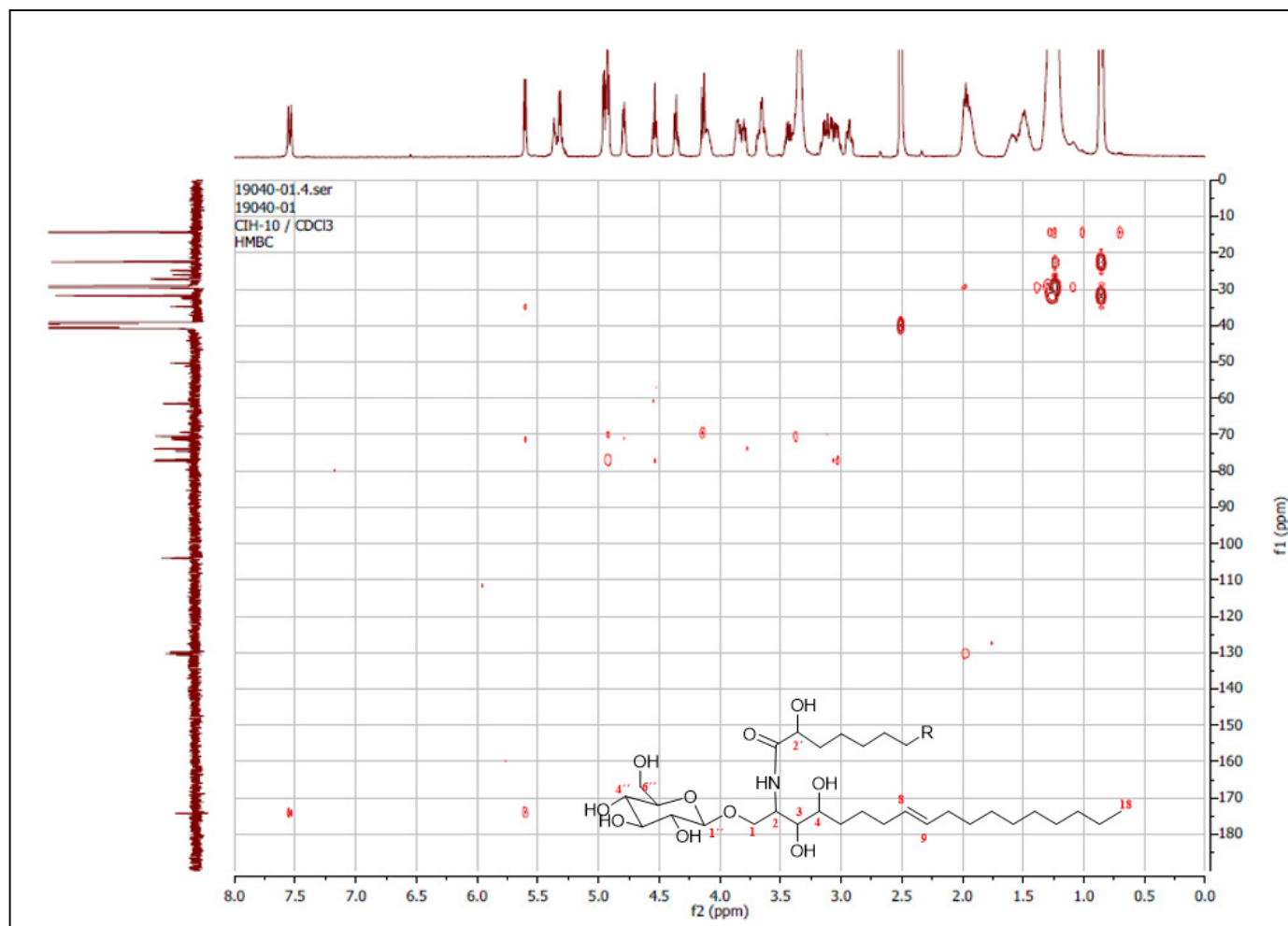


Figura 90. Espectro HMBC de **CIH-10**

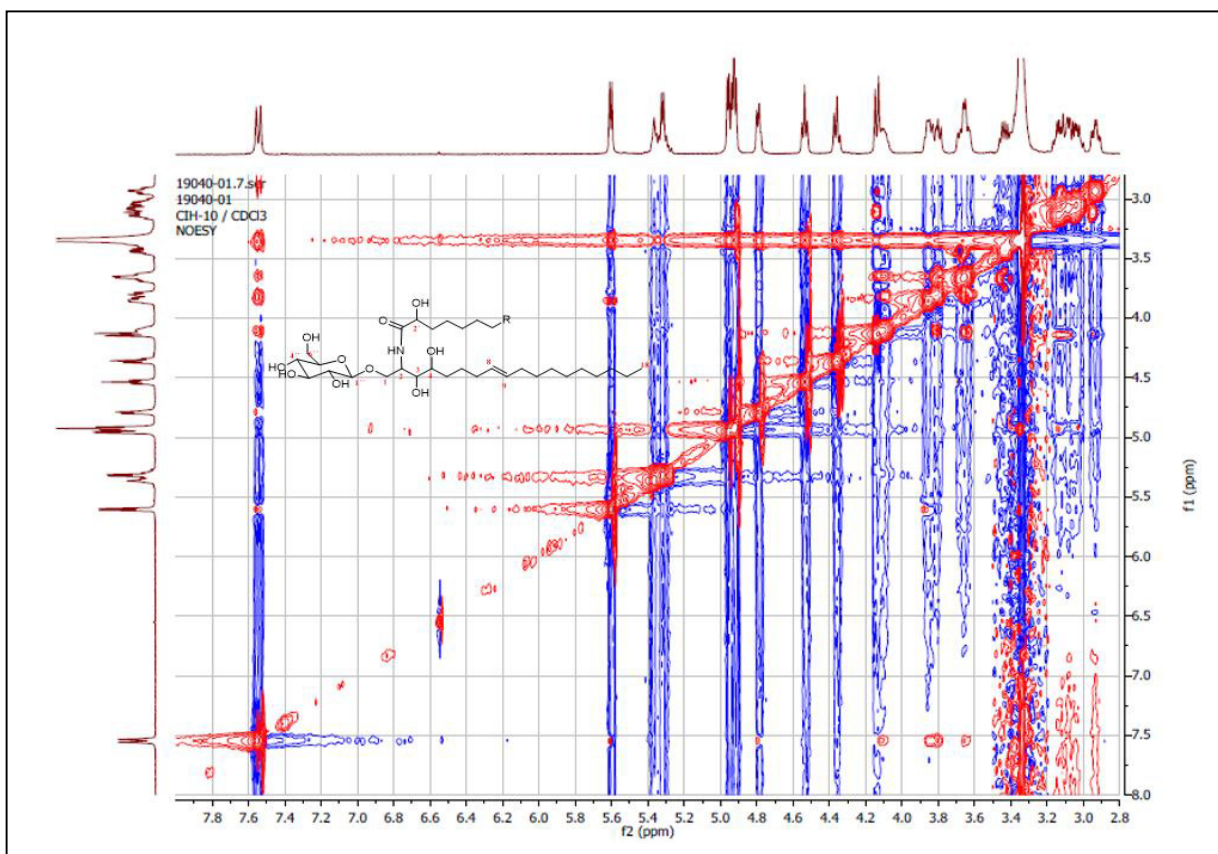


Figura 91. Espectro NOESY de CIH-10

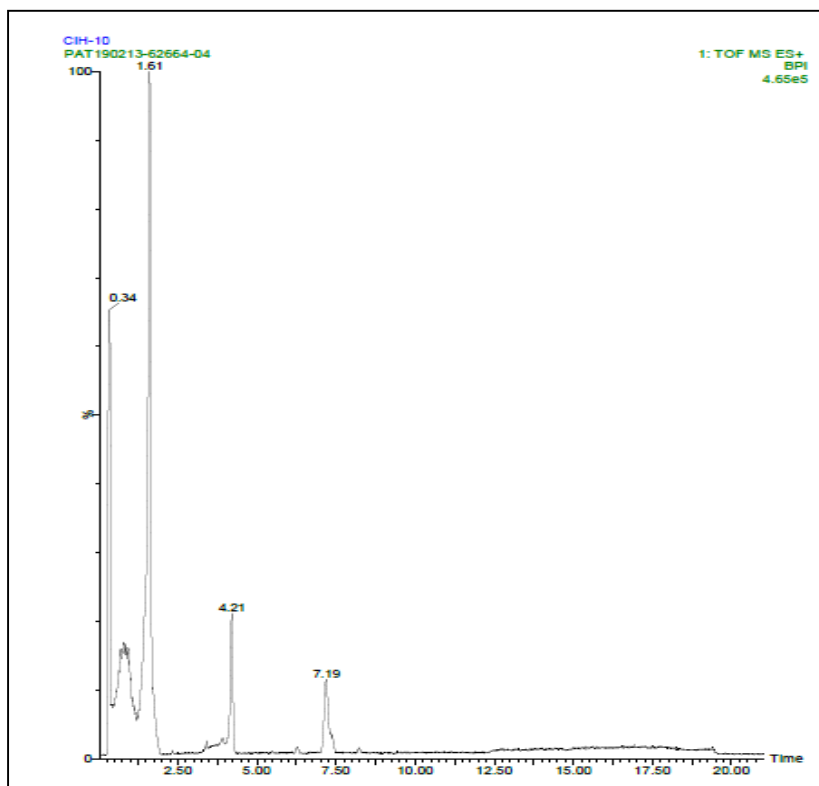


Figura 92. Cromatograma UPLC-QToF-MS de CIH-10

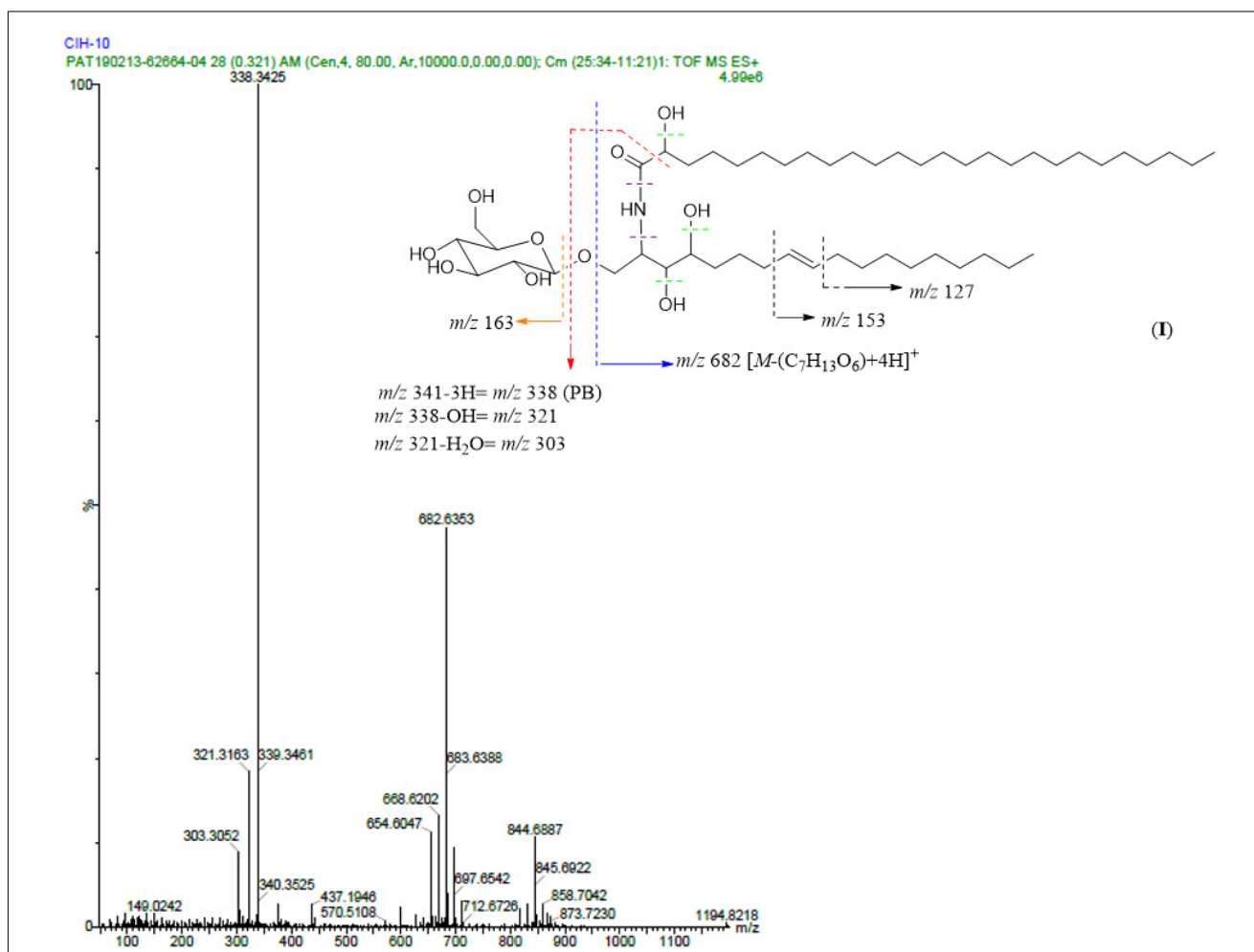


Figura 93. Espectro HRMS-ESI de **CIH-10-I** (espectro numérico en Apéndices)

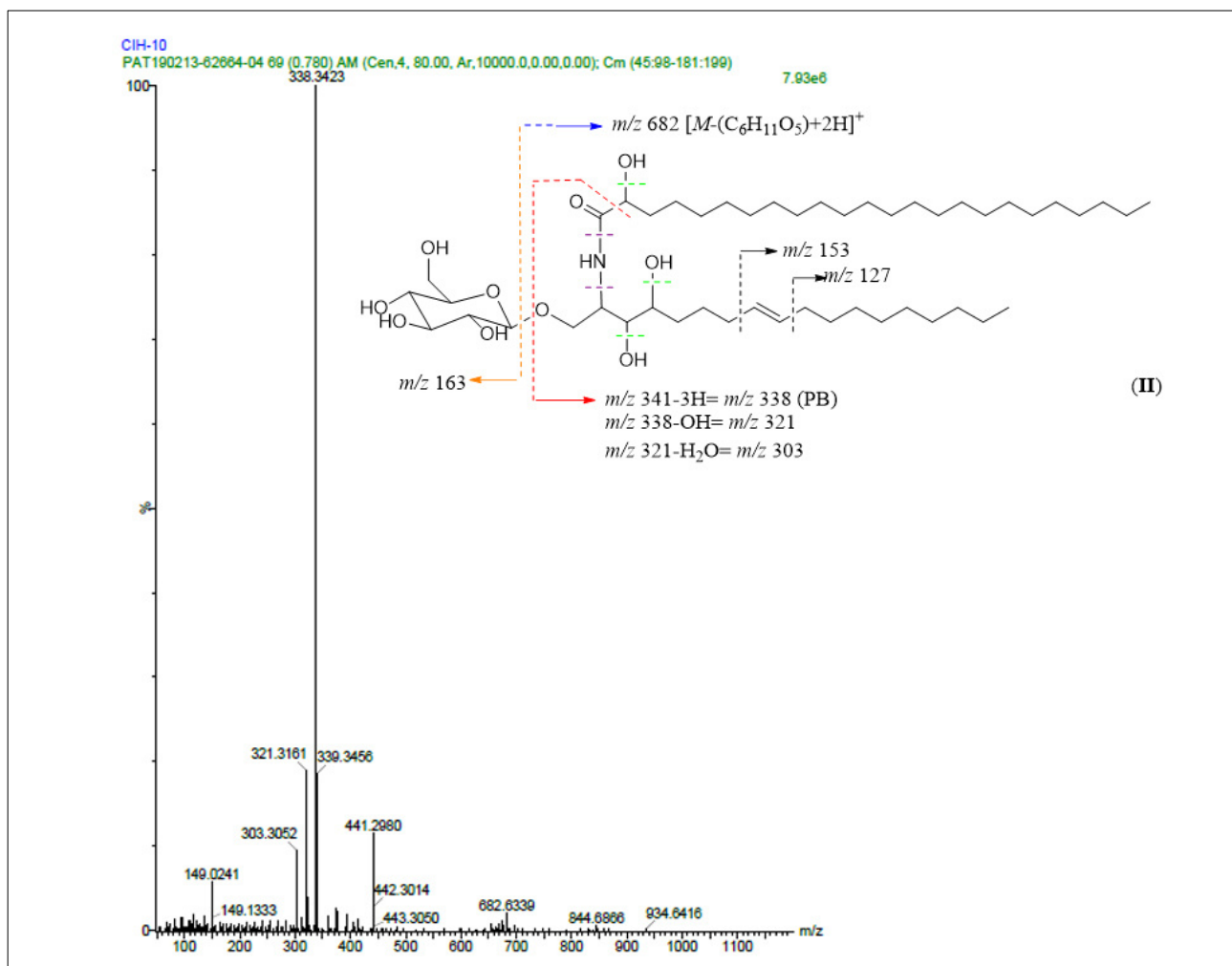


Figura 94. Espectro HRMS-ESI de **CIH-10-II** (espectro numérico en Apéndices)

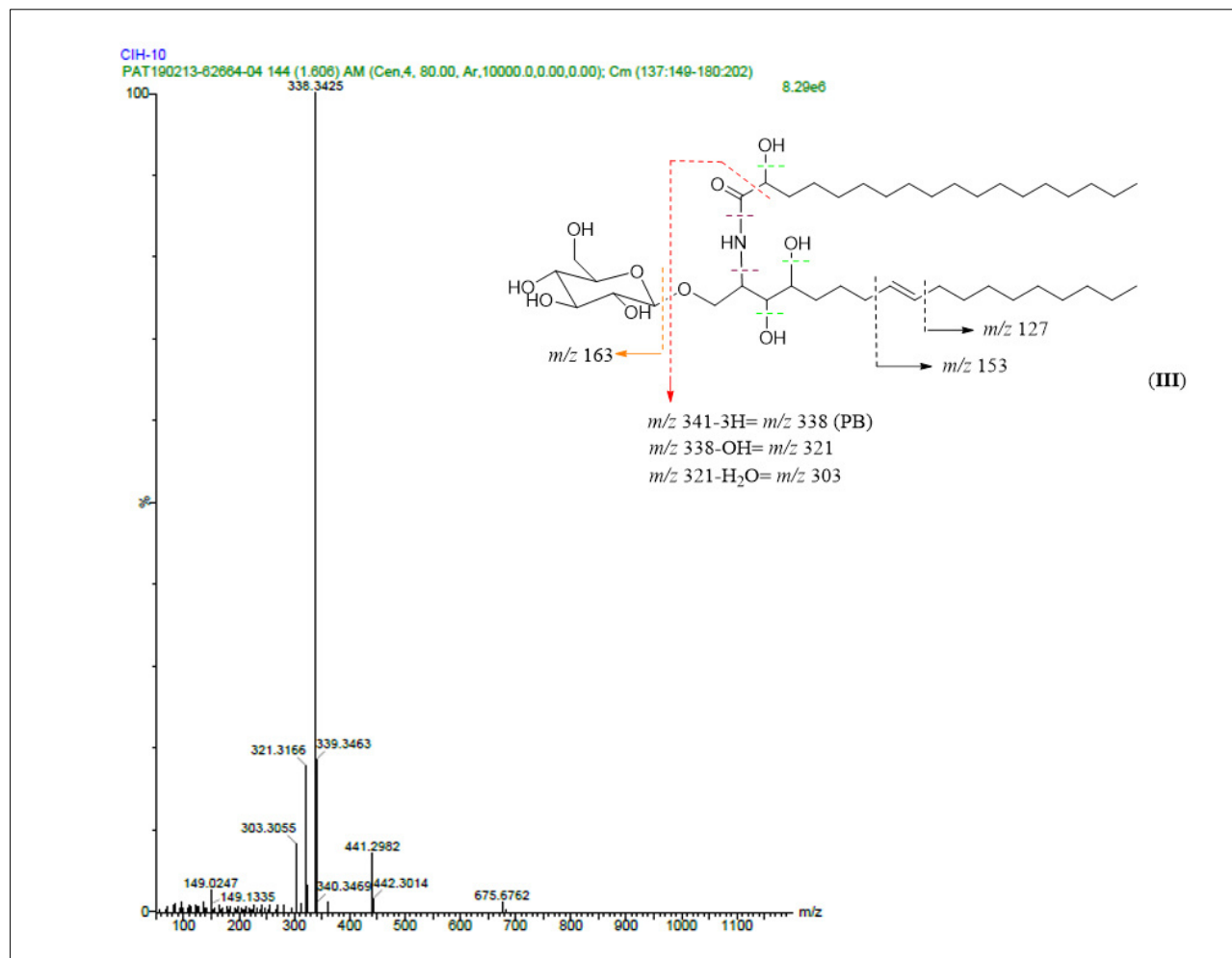


Figura 95. Espectro HRMS-ESI de CIH-10-III (espectro numérico en Apéndices)

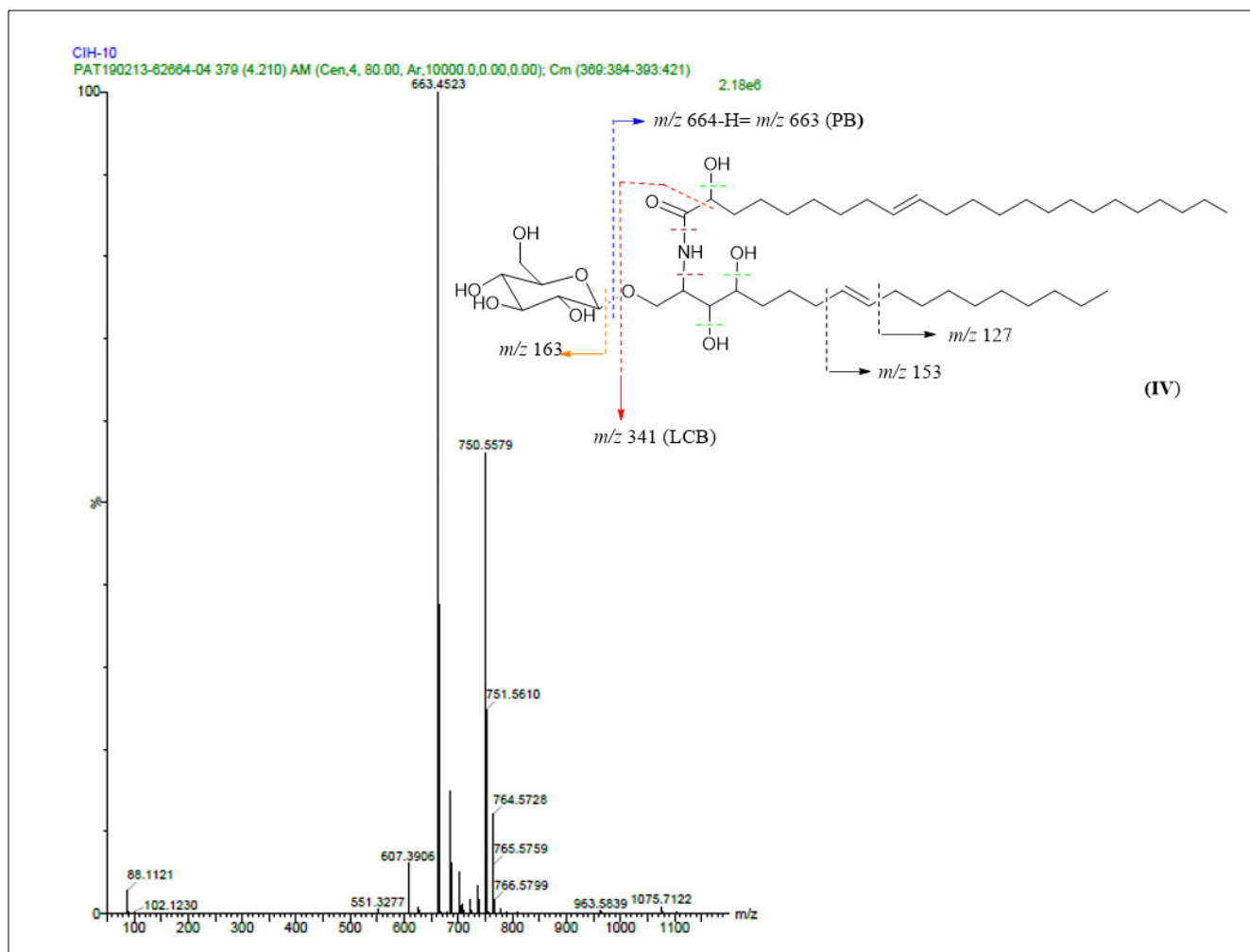


Figura 96. Espectro HRMS-ESI de **CIH-10-IV** (espectro numérico en Apéndices)

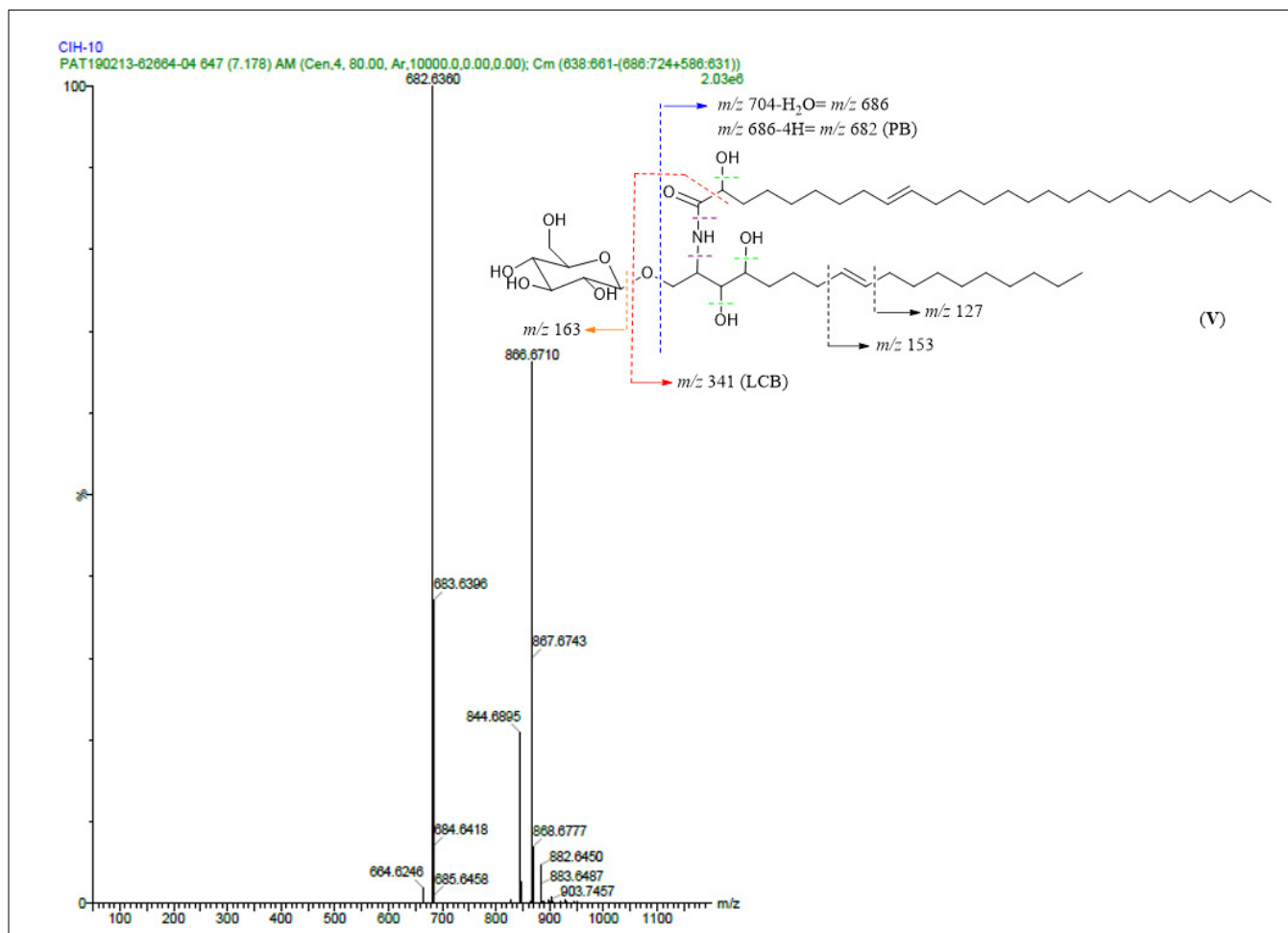


Figura 97. Espectro HRMS-ESI de **CIH-10-V** (espectro numérico en Apéndices)

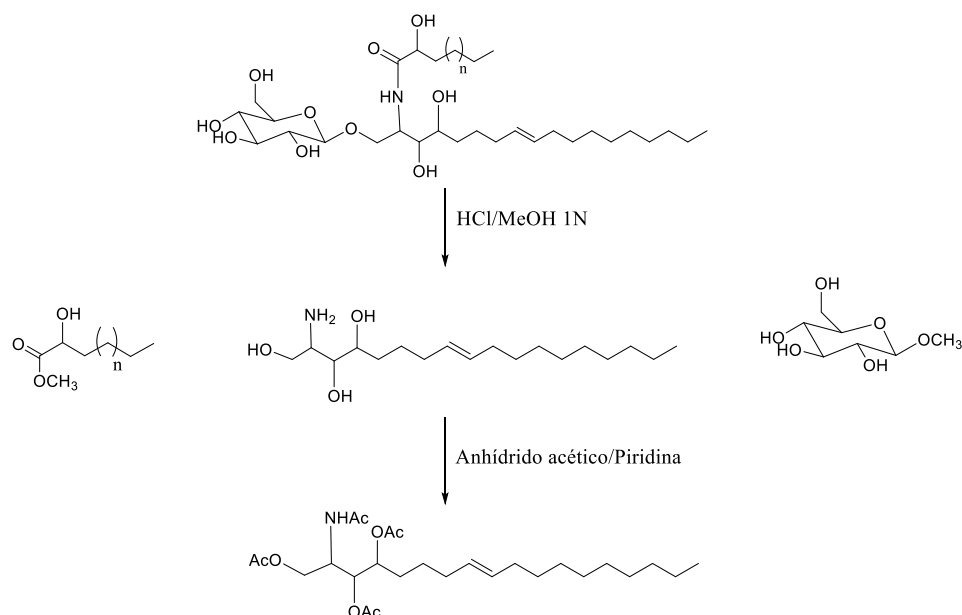


Figura 98. Esquema general de la reacción de metanólisis

Tabla 25. Comparación de datos espectroscópicos entre esqueleto de **CIH-10** y el de una ceramida natural

Posición	CIH-10 (DMSO- <i>d</i> 6)		Referencia ¹⁰⁷ (DMSO- <i>d</i> 6)	
	H ¹	C ¹³	H ¹	C ¹³
1	1α- 3.83 m	69.42	3.53 (d, <i>J</i> =5.4 Hz)	60.5*
	1β-3.66 m			
2	4.10 m	50.34	3.90 m	51.4
3	3.43 m	74.64	3.38 m	74.6
4	3.33 m	71.01	3.35 m	71.0
5	1.53 m	32.52	1.48 m	31.7
7	1.96 m	27.14	1.92 m	32.0
8	5.32 m	130.18	5.38 (dt, <i>J</i> (Hz)=5.0,15.0)	130.3
9	5.32 m	129.84	5.34 (dt, <i>J</i> (Hz)=5.0,15.0)	129.7
10	1.96 m	27.43	1.92 m	32.3
N-H	7.55 (d, <i>J</i> =9.4 Hz)	-	7.35 (d, <i>J</i> =9.0 Hz)	-
1'	-	174.25	-	173.5
2'	3.83 m	71.39	3.83 m	71.1
3'	α-1.60 m	34.81	1.48 m	34.5
	β-1.48 m			
(CH ₂) _n	1.24	22.57-26.10; 29.08- 31.77	1.23	22.1-31.3
Me	0.86 (t, <i>J</i> =6.62 Hz)	14.41	0.82 (t, <i>J</i> =6.6 Hz)	13.9
3-OH	4.54 (t, <i>J</i> =5.5 Hz)		4.56 (1 H, t, <i>J</i> =5.5 Hz)	
4-OH	4.36 (t, <i>J</i> =6.46 Hz)		4.32 (1 H, d, <i>J</i> =5.7 Hz)	
2'-OH	5.60 (d, <i>J</i> =5.12 Hz)		5.51 (1 H, d, <i>J</i> =4.8 Hz)	

*: La referencia es una ceramida

Tabla 26. Datos espectroscópicos de ^{13}C de **CIH-10**, esfingolípidos sintético y naturales

Posición	CIH-10	Cerebrósido natural ¹⁰⁹	Cerebrósido natural ¹¹²	Ceramida sintética ¹⁰⁵
1	70.21	70.4	70.4	70.3
2	51.50	51.8	51.7	51.6
3	75.64	75.9	76.0	75.80
4	72.18	72.4	72.5	72.60
1'	175.39	175.6	175.8	175.60
2'	72.23	72.5	72.5	72.60

5.1.2.16 Propiedades físicas y espectroscópicas de CIH-10Ac

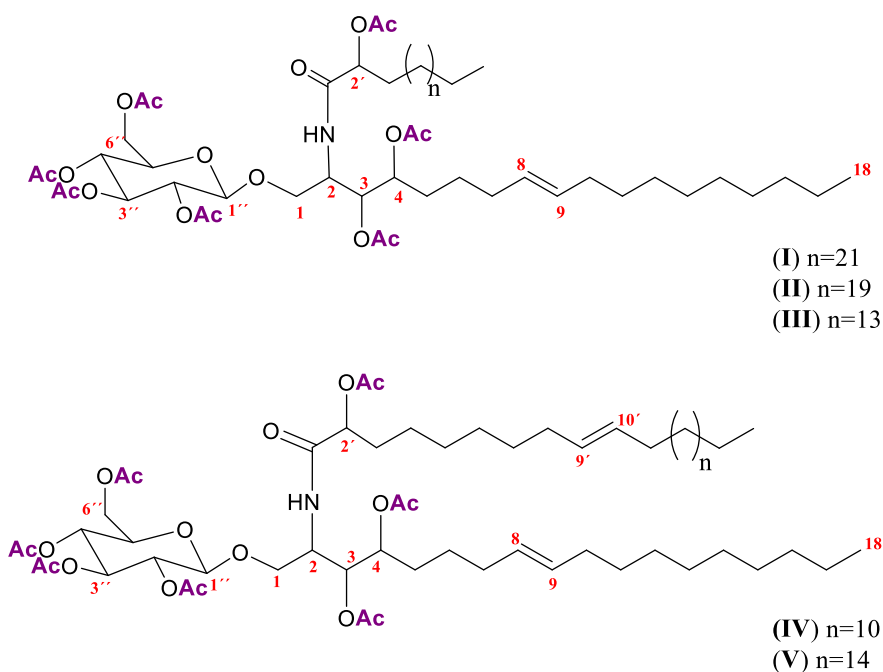


Figura 99. Estructuras de los compuestos identificados en **CIH-10Ac**

Resina amarilla, soluble en cloroformo, **I**: $\text{C}_{64}\text{H}_{111}\text{NO}_{17}$ ($\text{PM}_{\text{calc.}}$ 1165.79 g/mol), **II**: $\text{C}_{62}\text{H}_{107}\text{NO}_{17}$ ($\text{PM}_{\text{calc.}}$ 1137.75 g/mol), **III**: $\text{C}_{56}\text{H}_{95}\text{NO}_{17}$ ($\text{PM}_{\text{calc.}}$ 1053.66 g/mol), **IV**: $\text{C}_{61}\text{H}_{103}\text{NO}_{17}$ ($\text{PM}_{\text{calc.}}$ 1121.72 g/mol), **V**: $\text{C}_{65}\text{H}_{111}\text{NO}_{17}$ ($\text{PM}_{\text{calc.}}$ 1177.79 g/mol), (estructuras mostradas en la Figura 99).
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.90 (t, $J=6.62$ Hz, Me), 1.27 (sa, CH_2), 1.62 (m, H-10), 1.85 (m, H-3', H-5), 1.97 (m, H-7), 2.01 (s, $\text{CH}_3\text{CO-4}$) 2.04 (s, $\text{CH}_3\text{CO-3}$), 2.06 (s, $\text{CH}_3\text{CO-6''}$,

4''), 2.08 (s, $\underline{\text{CH}_3\text{CO-3''}}$), 2.11 (s, $\underline{\text{CH}_3\text{CO-2''}}$), 2.25 (s, $\underline{\text{CH}_3\text{CO-2'}}$), 3.71 (m, H-4'', H-6'' β), 3.88 (da, $J=9.8$ Hz, H-6'' α), 4.14 (da, $J=11.12$ Hz, H-1 β), 4.27 (m, H-2, H-1 α), 4.49 (d, $J=8.0$ Hz, H-1''), 4.91 (m, H-4, H-2''), 5.15 (m, H-5'', H-3, H-2', H-3''), 5.36 (m, H-8, H-9), 6.79 (d, $J=8.76$ Hz, N-H). RMN C^{13} (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 14.13 (Me), 20.55 ($\underline{\text{CH}_3\text{CO-6''}}$), 20.59 ($\underline{\text{CH}_3\text{CO-3''}}$), 20.68 ($\underline{\text{CH}_3\text{CO-2''}}$), 20.72 ($\underline{\text{CH}_3\text{CO-4''}}$), 20.94 ($\underline{\text{CH}_3\text{CO-3}}$), 21.01 ($\underline{\text{CH}_3\text{CO-4}}$), 21.03 ($\underline{\text{CH}_3\text{CO-2'}}$), 22.70 (CH_2), 24.90 (CH_2), 24.92 (CH_2), 25.75 (CH_2), 26.88 (CH_2), 27.29 (C10), 27.85, 27.95 (C17), 29.26 (CH_2), 29.29 (CH_2), 29.37 (CH_2), 29.49 (CH_2), 29.56 (CH_2), 29.62 (CH_2), 29.67 (CH_2), 29.72 (CH_2), 31.77 (CH_2), 31.92 (C5), 31.93 (C3'), 48.27 (C2), 61.76 (C1), 66.69 (C6''), 68.12 (C5''), 71.26 (C2'), 71.66 (C3''), 71.91 (C4''), 72.75 (C2''), 73.19 (C4), 73.98 (C3), 100.44 (C1''), 128.77 (C9), 130.68 (C8), 169.31 (C1'), 169.39 ($\underline{\text{CH}_3\text{CO-3''}}$), 169.80 ($\underline{\text{CH}_3\text{CO-2''}}$), 169.98 ($\underline{\text{CH}_3\text{CO-6''}}$), 170.23 ($\underline{\text{CH}_3\text{CO-4''}}$), 170.31 ($\underline{\text{CH}_3\text{CO-4}}$), 170.64 ($\underline{\text{CH}_3\text{CO-3}}$), 171.11 ($\underline{\text{CH}_3\text{CO-2'}}$).

5.1.2.16.1 Elucidación estructural de CIH-10Ac

El derivado acetilado de CIH-10 fue analizado utilizando las técnicas de RMN 1D y 2D. Se pudieron establecer las principales señales de los cerebrósidos en el espectro RMN ^1H : a campo alto ($\delta=0.90$) el triplete correspondiente a los metilos terminales, seguido de un singulete ancho (1.27 ppm) característicos de las cadenas alifáticas largas (Figura 100). A campos más bajos se pudo observar un multiplete en δ 5.36 para los protones H-8 y H-9 de la doble ligadura y un doblete en 6.79 ppm ($J=8.76$ Hz) correspondiente al protón de la amida. En la región comprendida entre 3.71 ppm y 5.15 ppm en el espectro RMN ^1H se observaron las señales de los protones base de los grupos ésteres (H-3, H-4, H-2', H-2'', H-3'', H-4'', H-6'' α , H-6'' β), la del protón del metino H-2 unido a nitrógeno (δ 4.27) y el doblete para el protón anomérico H-1'' en 4.49 ppm ($J=8.0$ Hz).

Como señales indicativas de cerebrósido en RMN ^{13}C pudimos encontrar las de los metilos terminales (δ_{C} 14.13), los carbonos de la glucosa (entre δ_{C} 66 y 73), el carbono anomérico (δ_{C} 100.44), una doble ligadura en δ 128.77 (C9), δ 130.68 (C8), y el carbonilo de la amida (δ 169.31) (Figura 102). Como resultado de la acetilación aparecieron como nuevas señales en el espectro de RMN ^1H los singuletes correspondientes a los siete acetilos, en δ : 2.01 ($\text{CH}_3\text{CO-4}$), 2.04 ($\text{CH}_3\text{CO-3''}$), 2.06 ($\text{CH}_3\text{CO-4'',2''}$), 2.08 ($\text{CH}_3\text{CO-6''}$), 2.11 ($\text{CH}_3\text{CO-3}$), y 2.25 ($\text{CH}_3\text{CO-2'}$). Estas señales son respaldadas por sus respectivos carbonos que se pudieron apreciar en el espectro de ^{13}C , en δ : 20.55 ($\text{CH}_3\text{CO-6''}$), 20.59 ($\text{CH}_3\text{CO-3''}$), 20.68 ($\text{CH}_3\text{CO-2''}$), 20.72 ($\text{CH}_3\text{CO-4''}$), 20.94 ($\text{CH}_3\text{CO-3}$), 21.01 ($\text{CH}_3\text{CO-4}$), y 21.03 ($\text{CH}_3\text{CO-2'}$). Finalmente, se observó entre δ 169.39 y 171.11 los carbonos de los carbonilos de los ésteres formados. Con estas señales quedó demostrada la presencia de los siete hidroxilos en el producto natural CIH-10. Para realizar las correspondientes asignaciones se tuvieron en cuenta los datos de los experimentos de doble dimensión COSY (Figura 101), HSQC (Figura 103), HMBC (Figura 104), aquellas realizadas al producto natural, así como su origen biogénico. La presencia de una LCB de 18 carbonos 1,3,4-trihidroxi insaturada se dedujo del espectro $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY, donde la señal a δ 6.79 (N-H), correlacionó con la señal a δ 4.27 (H-2) que, a su vez, mostró picos cruzados con protones de metileno (H-1) en δ 4.14 y δ 4.27 y (H-3) a 5.15 ppm. Este último correlacionado con la señal en δ 4.90 (H-4). La posición del doble enlace en la LCB fue determinada por HRMS-ESI en el producto natural. En el espectro HMBC del derivado acetilado se observaron correlaciones entre los protones H-8 y H-9 con los carbonos C10 y C7, respectivamente. La configuración *cis* del doble enlace se evidenció en el producto natural y también en su derivado acetilado por los desplazamientos químicos de los carbonos vecinos al doble enlace [δ 27.95 (C7), δ 27.29 (C10)]. La comparación de datos espectroscópicos con un

derivado esfingolípido similar, resultó útil para completar las asignaciones (Tabla 28). No obstante, podemos apreciar en RMN ^1H la no coincidencia en las integraciones con la totalidad de protones lo cual se explica porque estamos frente a una mezcla de compuestos. Sugiyama *et al.*¹⁰⁵ informaron que el desplazamiento químico de H-2 en RMN ^1H y los de C1, C2, C3, C4, C1' y C2' en ^{13}C para los esfingolípidos, podrían proporcionar información para la determinación de la estereoquímica absoluta. Al comparar los desplazamientos químicos de CIH-10Ac para H-2 en δ 4.27, C-1 en δ 61.76, C-2 en δ 48.27, C-3 (δ 73.98), C-4 (δ 73.19), C-1' (δ 169.31) y C-2' en δ 71.26, con los datos espectroscópicos de un esfingolípido análogo reportado, igualmente acetilado, observamos similitud entre ellos (ver Tabla 27). Sin embargo, no se pudo proponer configuración 2*S*, 3*S*, 4*R* en la LCB y 2' *R* en el ácido graso, basado en la ausencia de medición de la rotación óptica y al hecho de que CIH-10Ac fuera una mezcla acetilada de cerebrósidos. En CIH-10Ac la unión de las tres partes se comprobó mediante el experimento HMBC (Figura 104), en el cual C1'' correlacionó con H-2 (δ_{C} 100.44/ δ_{H} 4.27); C2 con N-H (δ_{C} 48.27/ δ_{H} 6.79) y C1' con N-H (δ_{C} 169.31/ δ_{H} 6.79). En base a la evidencia y discusión anteriores, **CIH-10Ac** se propuso como la mezcla de cinco cerebrósidos: 1-*O*-[2,3,4,6] tetraacetil- β -glucopiranosido de 2-(2'-acetil-hexacosanoil amino)-1,3,4-octadecanotriacet-8-ilo (**I**); 1-*O*-[2,3,4,6] tetraacetil- β -glucopiranosido de 2-(2'-acetil-tetracosanoil amino)-1,3,4-octadecanotriacet-8-ilo (**II**); 1-*O*-[2,3,4,6] tetraacetil- β -glucopiranosido de 2-(2'-acetil-octadecanoil amino)-1,3,4-octadecanotriacet-8-ilo (**III**); 1-*O*-[2,3,4,6] tetraacetil- β -glucopiranosido de 2-(2'-acetil-tricos-9-enoil amino)-1,3,4-octadecanotriacet-8-ilo (**IV**); y 1-*O*-[2,3,4,6] tetraacetil- β -glucopiranosido de 2-(2'-acetil-heptacos-9-enoil amino)-1,3,4-octadecanotriacet-8-ilo (**V**). Hasta el momento, los derivados acetilados **IV** y **V** no se han reportado en la literatura.

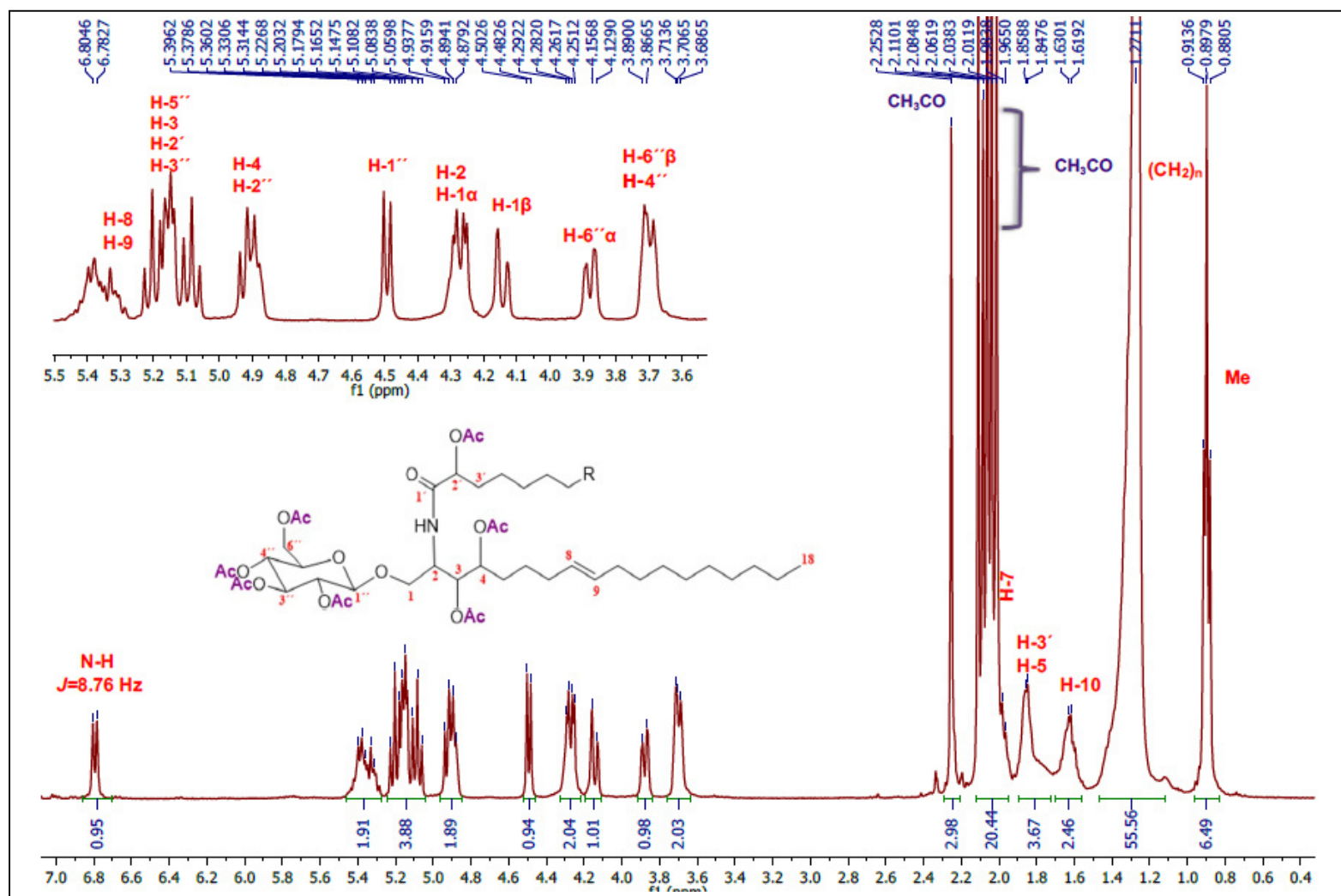


Figura 100. Espectro RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **CIH-10Ac**

*Estructura general de cerebrósidos caracterizados en CIH-10Ac

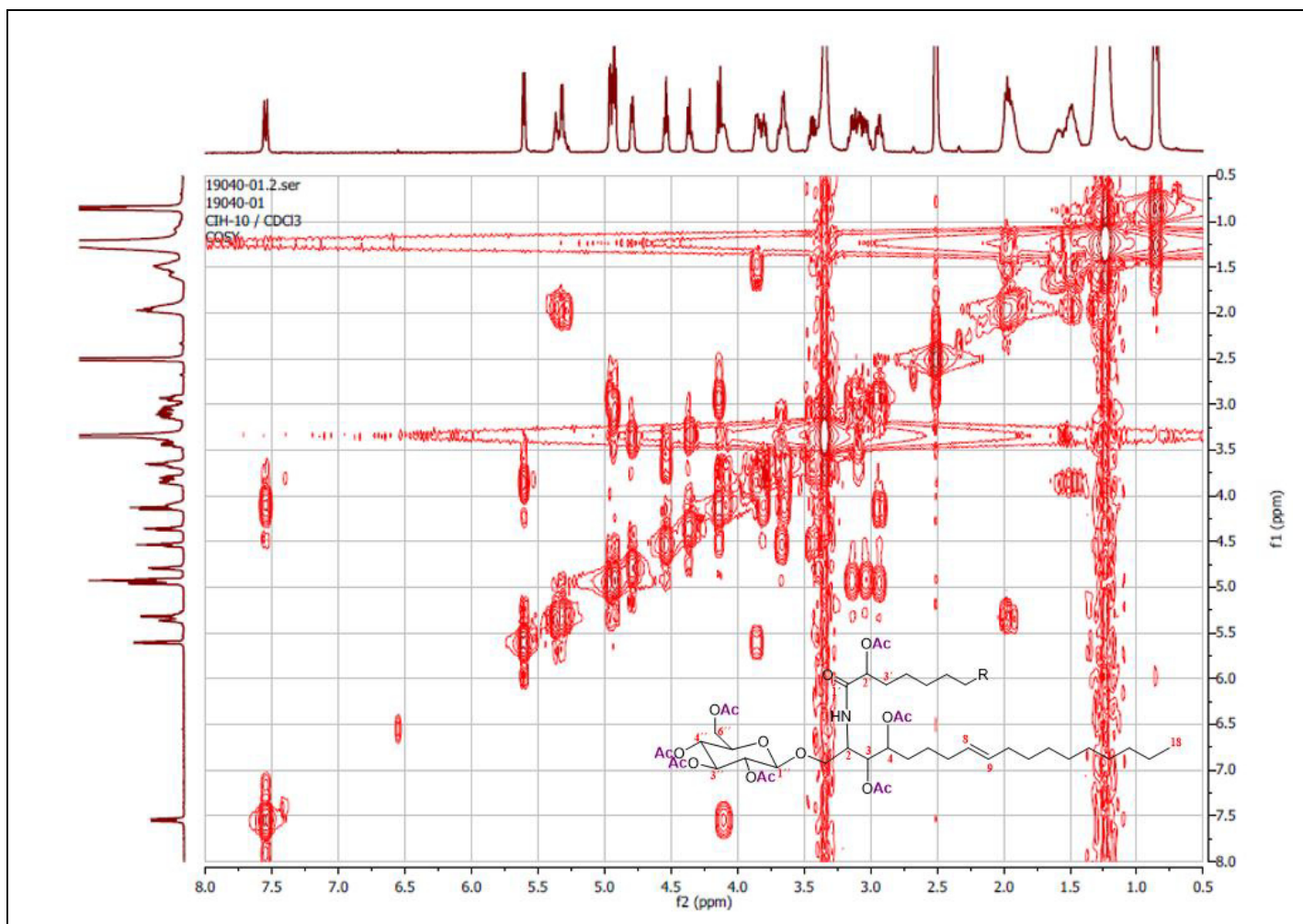


Figura 101. Espectro COSY de CIH-10Ac

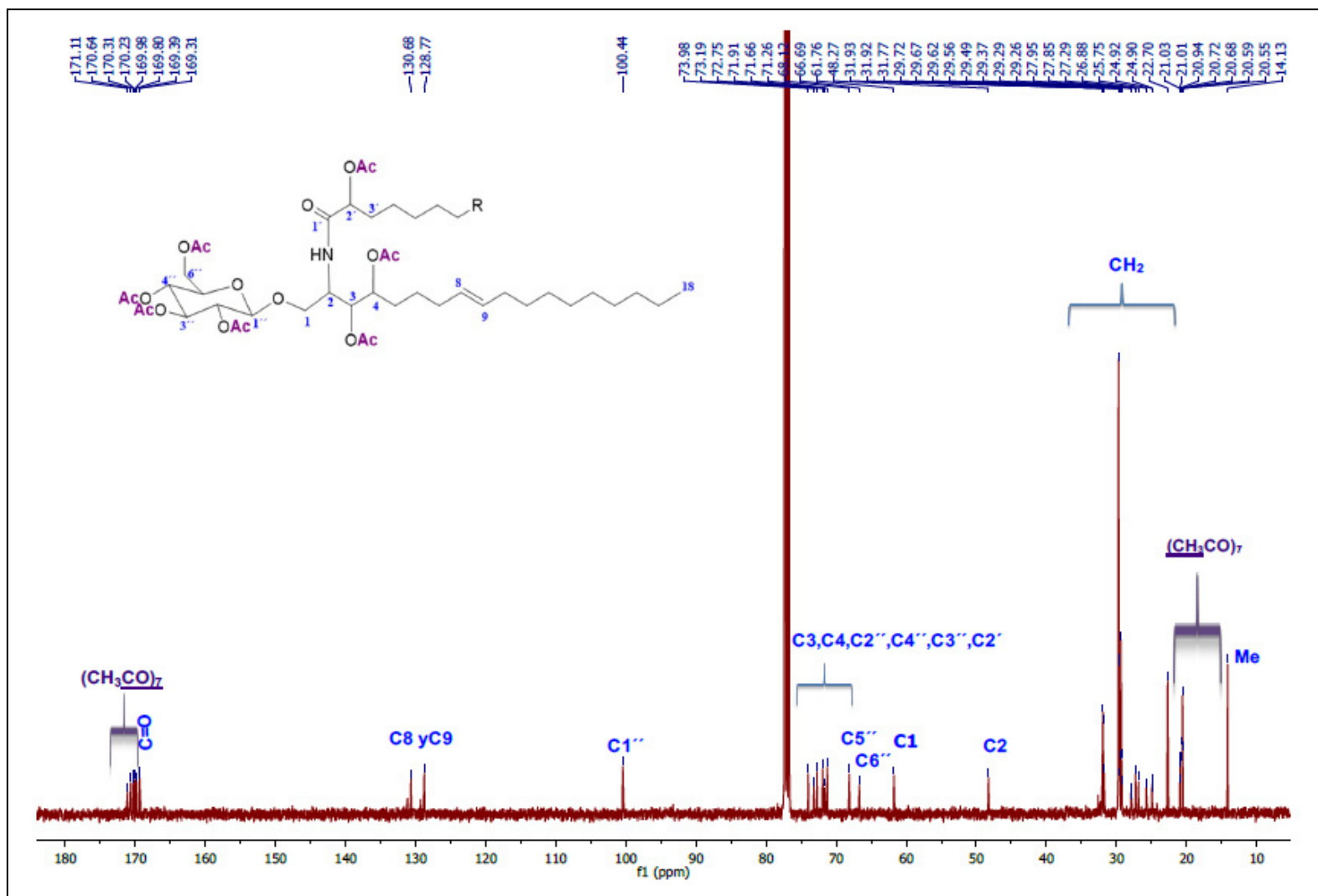


Figura 102. Espectro ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de CIH-10Ac

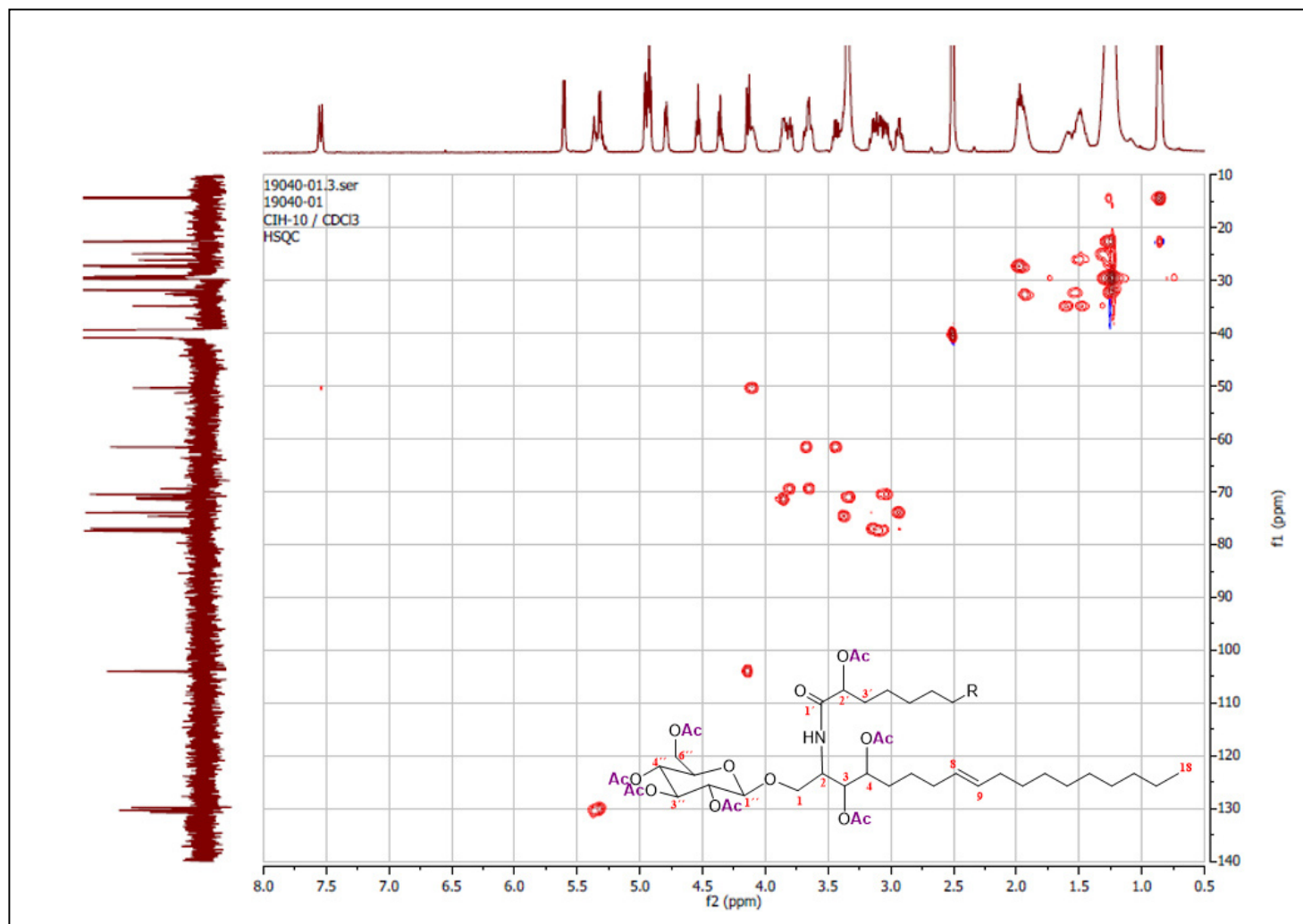


Figura 103. Espectro HSQC de CIH-10Ac

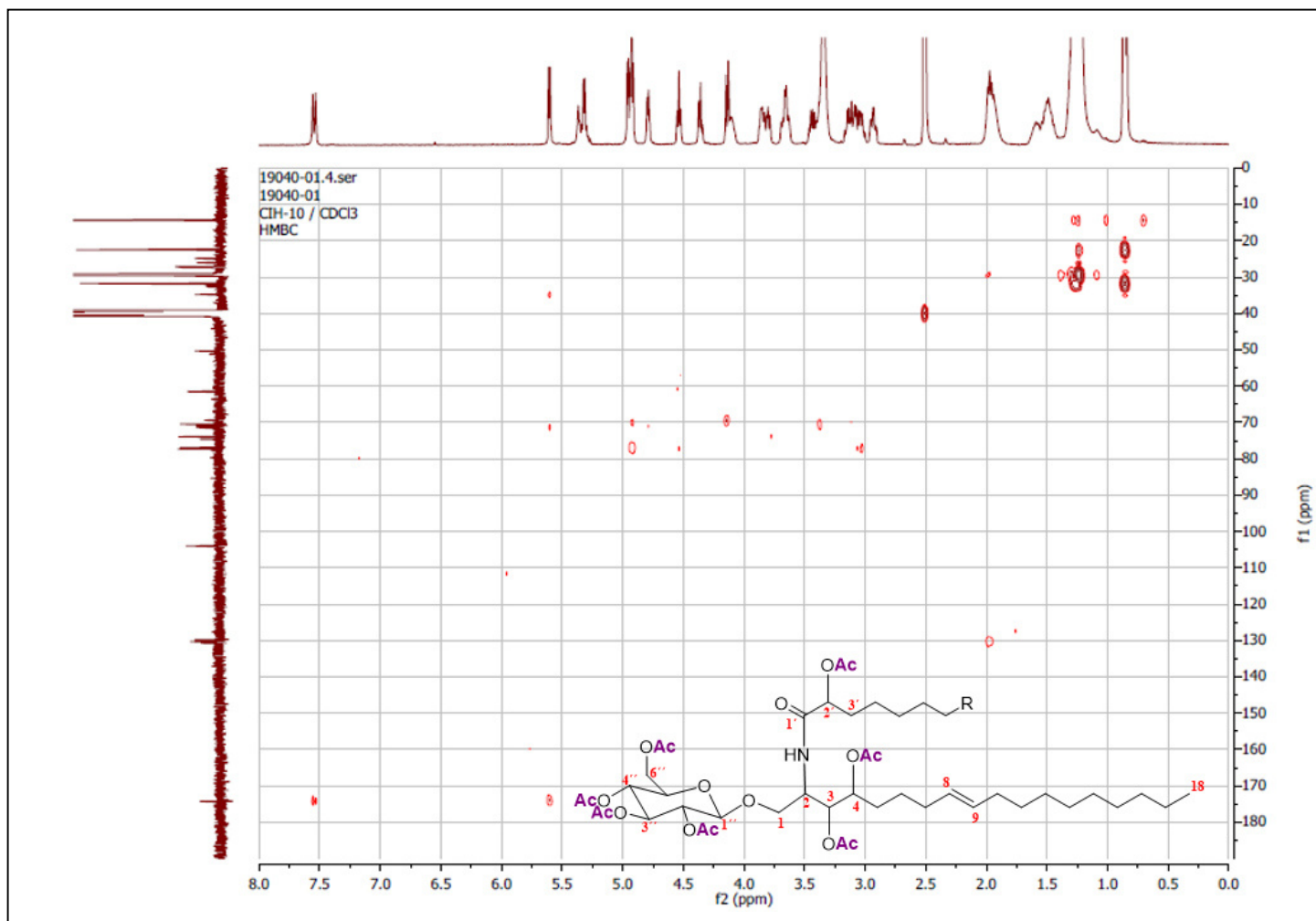


Figura 104. Espectro HMBC de CIH-10Ac

Tabla 27. Comparación de datos espectroscópicos de **CIH-10Ac** y derivado acetilado de esfingolípido natural

Posición	CIH-10Ac		Referencia ^{108*}	
	RMN ¹ H (CDCl ₃ 400 MHz)	RMN ¹³ C (CDCl ₃ 100 MHz)	RMN ¹ H (CDCl ₃ 400 MHz)	RMN ¹³ C (CDCl ₃ 100 MHz)
1	α- 4.27 m β- 4.14 (da, <i>J</i> = 11.12 Hz	61.76	1α- 4.34 (dd, <i>J</i> (Hz)= 3.0, 11.9) 1β- 4.01 (dd, <i>J</i> (Hz)= 6.4, 11.9)	62.3
2	4.27 m	48.27	4.45 m	47.9
3	5.15 m	73.98	5.10 m	74.0
4	4.91 m	73.19	5.09 m	72.6
5	1.81 m	31.92	1.80 m	31.8
7	1.97 m	27.95	1.95 m	32.6
8	5.36 m	130.68	5.36 (dt, <i>J</i> (Hz)=5.4, 15.6)	131.2
9	5.36 m	128.77	5.39 (dt, <i>J</i> (Hz)=5.6, 15.6)	129.3
10	1.62 m	27.29	1.95 m	32.2
CH ₂	1.27 sa	22.70- 26.88; 29.26- 31.92	1.25 sa	29.2~29.7
Me	0.90 (t, <i>J</i> =6.62 Hz)	14.13	0.88 (t, <i>J</i> =6.8 Hz)	14.1
1'	-	169.31	-	NR*
2'	5.15 m	71.26	4.95 (d, <i>J</i> =6.4 Hz)	72.7
3'	1.85 m	31.95	1.80 m	31.9
N-H	6.79 (d, <i>J</i> =8.76 Hz)	-	6.63 (d, <i>J</i> =9.2 Hz)	-
CH ₃ CO-3	2.04 s	20.94	2.06 s	20.8
CH ₃ CO-4	2.01 s	21.01	2.03 s	21.0
CH ₃ CO-2'	2.25 s	21.03	2.18 s	20.7
CH ₃ CO-3	-	170.64	-	170.9
CH ₃ CO-4	-	170.31	-	170.0
CH ₃ CO-2'	-	171.11	-	171.3

* La Referencia es una ceramida acetilada, NR: No Reportado en el artículo de referencia

5.2 Ensayos biológicos

5.2.1 Actividad antibacteriana y antimicobacteriana

Se determinó la actividad antibacteriana a 16 muestras incluyendo: tres extractos (hexánico, cloroformo/metanol y acuoso), tres compuestos identificados en el extracto hexánico, y seis compuestos aislados y caracterizados del extracto cloroformo/metanol. La actividad antibacteriana de las 16 muestras se realizó frente a nueve cepas de aislados clínicos farmacorresistentes: seis bacterias Gram-negativas y tres Gram-positivas. De las cuales, cuatro están identificadas como patógenos prioritarios según la alerta emitida por la OMS.²²

Los resultados de la actividad antibacteriana se muestran en la Tabla 28. Los extractos orgánicos fueron más activos que el extracto acuoso frente a las nueve cepas ensayadas teniendo valores de CMI entre 125-500 µg/mL, aunque el extracto hexánico no mostró actividad (CMI >500 µg/mL) contra *S. aureus* resistente a meticilina.

El género *Cissus* ha sido explorado anteriormente para la actividad antibacteriana. Un extracto metanólico de las hojas de *C. verticillata* fue ensayado frente a cepas ATCC de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *E. coli*, mostrando valores de CMI ≥ 300 µg/mL para todas las cepas ensayadas.¹¹³ Esto contrasta con nuestros resultados donde observamos actividad contra las bacterias resistentes, excepto *S. aureus* resistente a meticilina. Cabe destacar que nuestro estudio antibacteriano fue realizado utilizando aislados clínicos multifarmacorresistentes, los cuales tienen varios mecanismos de resistencia, adquiridos o heredados, que los hacen más difíciles de tratar, convirtiendo a los extractos de *C. incisa* fuente de potenciales agentes contra bacterias resistentes.

Tabla 28. Actividad antibacteriana y antimicobacteriana de extractos y compuestos caracterizados de las hojas de *C. incisa*

Extractos/ Compuestos ^a	CMI (µg/mL)										
	SARM	SERL	EFRV	ABRC	ECPB	PARC	KPNDM-1+	KPPB	KPRO	MT- H37Rv	MT- G122
Extracto hexánico	>500	500	125	125	250	125	250	250	250	250	125
Extracto CHCl ₃ /MeOH	500	500	125	125	250	125	250	250	250	250	250
Extracto acuoso	500	500	500	250	500	500	250	250	500	>500	500
fitol	>200	200	100	100	200	200	200	200	200	ND	ND
α-amirina	>200	200	200	100	200	200	>200	200	200	ND	ND
β-amirina	>200	>200	>200	200	>200	200	>200	>200	>200	ND	ND
CIH-2	>200	200	200	200	>200	200	200	>200	200	ND	ND
CIH-2Ac	>200	200	200	100	200	200	>200	200	200	ND	ND
CIH-7	>200	200	200	200	>200	200	200	>200	200	ND	ND
CIH-8	>200	200	200	200	>200	200	>200	>200	200	ND	ND

^a: CIH-2=β-sitosterol, CIH-2Ac Acetato de estigmasta-5-en-3-β-ilo, CIH-7=tetracosanoato de 2,3-dihidroxipropilo, CIH-8=β-D-glucopiranosido de β-sitosterol

^b: SARM=*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, SERL=*Staphylococcus epidermidis* resistente a linezolid, EFRV=*Enterococcus faecium* resistente a vancomicina, ABRC=*Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos, ECPB=*Escherichia coli* productora de BLEE, PARC=*Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos, KPNDM-1+=*Klebsiella pneumoniae* NDM-1+, KPPB=*Klebsiella pneumoniae* productora de BLEE, KPRO=*Klebsiella pneumoniae* resistente a oxacilinas, MT-H37Rv=*M. tuberculosis* cepa H37Rv, MT-G122=*M. tuberculosis* cepa G122, ND=No determinado

Tabla 28. Actividad antibacteriana y antimicobacteriana de extractos y compuestos caracterizados de las hojas de *C. incisa*.

Continuación

Extractos/ Compuestos ^a	CMI (µg/mL)										
	SARM	SERL	EFRV	ABRC	ECPB	PARC	KPNDM-1+	KPPB	KPRO	MT-H37Rv	MT-G122
CIH-8Ac	>200	>200	200	200	>200	200	>200	>200	200	ND	ND
CIH-10	>200	>200	>200	>200	>200	100	>200	>200	>200	ND	ND
CIH-10Ac	>200	>200	>200	200	>200	200	200	200	200	ND	ND
CIH-11	>200	>200	>200	>200	>200	100	>200	>200	>200	ND	ND
CIH-13	>200	>200	200	50	>200	100	200	200	200	ND	ND
CIH-13Ac	>200	>200	100	200	>200	200	>200	>200	200	ND	ND
Levofloxacin	12.5	6.25	12.5	12.5	25	0.78	>50	12.5	>50	ND	ND
Isoniacida	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.195	>50
Rifampicina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.195	>50
Etambutol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3.12	50

^a: CIH-8Ac=β-D-tetraacetyl glucopiranosido de β-sitosterilo, CIH-10=mezcla de cerebrósidos, CIH-10Ac=mezcla de cerebrósidos acetilados, CIH-11=α- amirina-3-O-glucopiranosido, CIH-13=mezcla de ceramidas, CIH-13Ac=mezcla de ceramidas acetiladas

^b: SARM=*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, SER=*Staphylococcus epidermidis* resistente a linezolid, EFRV=*Enterococcus faecium* resistente a vancomicina, ABRC=*Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos, ECPB=*Escherichia coli* productora de BLEE, PARC=*Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos, KPNDM-1+ =*Klebsiella pneumoniae* NDM-1+, KPPB=*Klebsiella pneumoniae* productora de BLEE, KPRO=*Klebsiella pneumoniae* resistente a oxacilinas, MT-H37Rv=*M. tuberculosis* cepa H37Rv, MT-G122=*M. tuberculosis* cepa G122 , ND=No determinado

Las bacterias más sensibles a la acción de los extractos orgánicos fueron: *A. baumannii* resistente a carbapenémicos, *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos y *E. faecium* resistente a vancomicina, todas con valores de CMI de 125 µg/mL, seguida de *E. coli* productora de BLEE (CMI=250 µg/mL). Con base a estos datos, se puede observar que los extractos orgánicos tienen mejor actividad frente a las bacterias Gram-negativas que para las Gram-positivas. Estos resultados son comparables con los obtenidos por Shoibe *et al.*¹¹⁴, quienes prepararon un extracto etanólico de hojas de *C. adnata*, le determinaron su actividad antibacteriana frente a bacterias ATCC *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *E. coli* obteniendo mejor actividad para las Gram-negativas que para las Gram-positivas, con un rango de concentraciones entre 800-1000 µg/mL. Es importante señalar que en nuestro estudio se obtuvo mejor actividad antibacteriana (CMI 125-250 µg/mL) frente a las mismas bacterias; pero que en nuestro caso proceden de aislados clínicos farmacorresistentes, los cuales han desarrollado mecanismos de resistencia contra al menos un antibiótico de importancia clínica.

La actividad antimicobacteriana solamente fue evaluada a nivel de extractos (Tabla 28). Los mejores resultados se obtuvieron para los extractos cloroformo/metanol y hexánico. Al igual que en la actividad antibacteriana, el extracto acuoso fue el menos activo. El hecho de que los extractos cloroformo/metanol y hexánico hayan sido activos sobre la cepa resistente G122, es satisfactorio y se une a los esfuerzos de otros investigadores que han descrito los efectos de extractos y compuestos puros sobre *M. tuberculosis* multifarmacorresistente. Por lo que consideramos atractiva la exploración futura de *C. incisa* sobre cepas TB-MFR para evaluar su potencial antituberculoso. Teniendo en cuenta la necesidad a nivel mundial de encontrar compuestos que acorten o coadyuven en el

tratamiento de la TB-MFR y TB-XFR, o bien con mecanismo de acción diferente a los existentes.¹¹⁵

La gama relativamente amplia de propiedades antibacterianas de los extractos puede explicarse por la presencia de diferentes tipos de metabolitos secundarios potencialmente activos detectados en ellos. El efecto antibacteriano de dichos extractos puede deberse a un efecto individual o combinado de los grupos de fitoconstituyentes identificados en ellos.¹¹⁴

Entre los compuestos evaluados, el más activo fue CIH-13 frente a *A. baumannii* resistente a carbapenémicos, con una CMI de 50 µg/mL (Tabla 28). Dicho valor no supera la CMI del estándar levofloxacin (12.5 µg/mL) pero este resultado se considera muy interesante ya que este patógeno se ha convertido en uno de los más peligrosos debido a su increíble capacidad para adquirir resistencia a los antimicrobianos. Varias cepas de *A. baumannii* son altamente resistentes a la mayoría de los antibióticos disponibles clínicamente.¹¹⁶

Las ceramidas y sus derivados esfingolípidos relacionados son lípidos bioactivos con una amplia gama de estructuras. Esto permite que estas moléculas participen en actividades tan diversas como la integridad estructural de las membranas y en la formación de dominios de membrana; como metabolitos que median procesos celulares como la muerte celular programada y la transducción de señales, así como en la respuesta de las plantas a la hipoxia y al ataque de patógenos. Algunos estudios sugieren que constituyen hasta el 10% de los lípidos de las plantas.¹⁰¹ Se tienen reportes de estudios biológicos realizados a ceramidas de origen natural, específicamente para la actividad citotóxica en células de cáncer de pulmón, próstata, entre otros.^{117,118} En relación a la actividad antibacteriana, el

número de investigaciones hasta el momento, es menor. Aún en la actualidad se están descubriendo nuevas estructuras lipídicas de plantas y ensayando su potencial terapéutico. Otros compuestos como, α -amirina, fitol, y acetato de β -sitosterol, exhibieron moderada actividad antibacteriana (CMI 100 $\mu\text{g/mL}$) contra *A. baumannii* resistente a carbapenémicos. Adicionalmente, el fitol presentó actividad moderada con CMI de 100 $\mu\text{g/mL}$ contra *E. faecium* resistente a vancomicina. Por otro lado, los compuestos CIH-10, α -amirina-3-*O*-glucopiranosido, y CIH-13 también mostraron moderada actividad (CMI 100 $\mu\text{g/mL}$) contra *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos. Se ha informado previamente la actividad antimicrobiana de terpenos pentacíclicos (α y β -amirinas, betulina, ácidos betulínico y oleanólico) por Vázquez *et al.*¹¹⁹ Quienes reportaron un rango de CMI de 64-1088 $\mu\text{g/mL}$ frente a cepas de *S. aureus* sensibles y resistentes a la metilicina, cepas ATCC de *K. pneumoniae*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *S. epidermidis*, *S. pneumoniae*, *C. albicans* y *Shigella flexneri*.

De igual manera se describe débil actividad antibacteriana para α -amirina (CMI 1024 $\mu\text{g/mL}$), entre otros triterpenos, en el trabajo de Abreu *et al.*¹²⁰. En dicho estudio este compuesto fue evaluado frente a cepas ATCC de *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, y *Citrobacter freundii*. Por su parte, al fitol, ampliamente distribuido como componente de la clorofila, también le han sido determinadas sus propiedades antibacterianas frente a diferentes cepas patógenas, un ejemplo muy ilustrativo es la CMI de 20 $\mu\text{g/mL}$ alcanzada frente a *P. aeruginosa* ATCC en el trabajo de Lee *et al.*¹²¹

Según se aprecia en la referida Tabla 28, de manera general los derivados acetilados no superaron en su acción antibacteriana a sus productos naturales. Para el esteroide y su glucósido, este resultado concuerda con el obtenido por Abreu *et al.*¹²⁰ quienes

concluyeron en su estudio que el grupo hidroxilo libre en la posición 3 pudiera estar relacionado con la actividad bactericida de los compuestos ensayados, en su caso, triterpenos. Los resultados de la baja actividad antibacteriana de los derivados acetilados de ceramidas y cerebrósidos están acorde a los reportados por Möuts *et al.*¹²² En su estudio estos investigadores refieren la importancia de los grupos funcionales C (1) -OH y C (3) -OH de la base de cadena larga de ceramida para la interacción interlipídica y la segregación lateral en dominios ricos en ceramida, siendo éste uno de los mecanismos por los que las ceramidas modifican la permeabilidad de las membranas. No obstante, la obtención de derivados semisintéticos es una estrategia utilizada para mejorar múltiples características de los antibióticos naturales. Estos incluyen: mejorar la potencia y el espectro, particularmente la actividad contra organismos resistentes; mejorar las características fisicoquímicas similares a las del fármaco comercial tales como la solubilidad, la farmacocinética, la unión a proteínas y la biodisponibilidad oral; así como la toxicidad y otros efectos no deseados.¹²³

Por otro lado, los monoglicéridos, y los acilglicerol o glicéridos son ésteres de ácidos grasos con glicerol. Son muy abundantes en el tejido adiposo animal, en las semillas y frutos de las plantas oleaginosas, los cuales pueden presentarse como mono, di o triglicéridos, no se ha reportado hasta el momento alguna actividad biológica de estos compuestos.¹²⁴

Tal y como se ha expuesto a lo largo de nuestro trabajo, es la primera vez que se realizan ensayos biológicos a *C. incisa*, por lo que estos pueden considerarse un “screening” de sus efectos potenciales. Aunque los resultados anteriormente discutidos para la actividad antimicrobiana son aceptables, en ningún caso (extracto ó compuesto aislado) se logra superar al valor de CMI de los controles positivos empleados.

En relación con las cepas ensayadas, obtuvimos que la más sensible a la acción de los compuestos estudiados, fue *A. baumannii* resistente a carbapenémicos (CMI 50-200 µg/mL), mientras que la más resistente fue *S. aureus* resistente a meticilina (CMI >200 µg/mL), coincidiendo estos resultados con los obtenidos para los extractos. Como se puede observar, la mejor actividad se presentó frente a las especies Gram-negativas. A diferencia de las Gram-positivas, que presentan una pared celular compuesta por una gruesa capa de peptidoglucano, la pared celular de las Gram-negativas está formada por una fina capa de peptidoglicano, rodeada a su vez por la membrana externa que en su constitución mayoritaria presenta lipopolisacáridos, con su parte heteropolisacárida (hidrofílica) orientada hacia el exterior, además de porinas que constituyen canales para el transporte de nutrientes y otras moléculas.¹²⁵ Es posible que la estructura de los compuestos ensayados les permitió interactuar con los lipopolisacáridos ó bien, utilizar la porinas para atravesar estas barreras, lo cual se convierte en algo muy valioso, pues si bien la actividad antibacteriana de nuestros compuestos no es la mejor, el hecho de que puedan cruzar la membrana externa, los convierte en buenos candidatos para ser combinados con antibacterianos comerciales que actualmente no puedan ser utilizados para tratar infecciones producidas por Gram-negativas debido al impedimento que constituye la envoltura celular de estas bacterias. En este sentido, los productos naturales y aquellos optimizados por síntesis, se convertirán en la próxima generación de agentes antibacterianos.¹²³

5.2.2 Actividad citotóxica e índice de selectividad

5.2.2.1 Actividad citotóxica e índice de selectividad de extractos

Se determinó la actividad citotóxica de los tres extractos obtenidos: hexánico, cloroformo/metanol y acuoso, frente a seis líneas de células de cáncer: Hep3B y HepG2

(carcinoma hepatocelular), HeLa (cervico-uterino), A549 (pulmón), PC3 (próstata) y MCF7 (mama), y una línea celular de hepatocitos humanos inmortalizados (IHH) como control de células no cancerosas que resultó útil para determinar la selectividad contra las líneas cancerosas hepáticas mediante el cálculo del índice de selectividad (IS).

De acuerdo a los criterios del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos de América, un extracto es considerado activo si tiene una $IC_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$ sobre células tumorales¹²⁶. En este trabajo, la actividad de los extractos se consideró *alta* si era $\leq 30 \mu\text{g/mL}$, *media* si era de $31\text{--}60 \mu\text{g/mL}$ y *baja* si era de $61\text{--}99 \mu\text{g/mL}$, tal y como aparece en el estudio de Moo-Puc *et al.*¹²⁷

Los resultados de la actividad citotóxica se reflejan en la Tabla 29. Se aprecia que el extracto hexánico tuvo una alta actividad citotóxica para HepG2 ($IC_{50} = 30 \pm 6 \mu\text{g/mL}$) y Hep3B ($IC_{50} = 27 \pm 3 \mu\text{g/mL}$), moderada actividad para las líneas cancerígenas Hela y A549 ($IC_{50} = 40 \pm 2$ y $52 \pm 2 \mu\text{g/mL}$), mientras que, frente a los cánceres de próstata y mama, su actividad fue baja con valores de IC_{50} por encima de $70 \mu\text{g/mL}$.

Por su parte, el extracto $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ mostró moderada citotoxicidad frente a HepG2 y Hep3B ($IC_{50} = 39 \mu\text{g/mL}$ y $31 \mu\text{g/mL}$, respectivamente), así como baja actividad frente a Hela, A549, PC3 y MCF7 con valores de IC_{50} de 61 ± 4 , 77 ± 6 , 57 ± 4 y $50.67 \pm 6 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. El extracto acuoso, tal y como se muestra en la Tabla 29, no tuvo actividad citotóxica en las concentraciones ensayadas ($IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$).

Tabla 29. Resultados de citotoxicidad de los extractos de las hojas de *C. incisa*

Línea celular	Extracto hexánico		Extracto CHCl ₃ /MeOH 1:1		Extracto acuoso		Paclitaxel	
	IC ₅₀ (µg/mL)	IS	IC ₅₀ (µg/mL)	IS	IC ₅₀ (µg/mL)	IS	IC ₅₀ (µg/mL)	IS
HepG2	30±6	1.5	39±3	2.21	>100	ND	64 x 10 ⁻³	1.24
Hep3B	27±3	1.66	31±2	2.77	>100	ND	33 x 10 ⁻³	2.41
HeLa	40±2	ND	61±4	ND	>100	ND	4.78 x 10 ⁻³	ND
A549	52±2	ND	77±6	ND	>100	ND	5.12 x 10 ⁻³	ND
PC3	76±5	ND	57±4	ND	>100	ND	10.2 x 10 ⁻³	ND
MCF7	74±6	ND	50.67±6	ND	>100	ND	4.27 x 10 ⁻³	ND
IHH	45±3		86±5		>100		79.4 x10 ⁻³	

ND: No Determinado

La actividad antibacteriana (CMI) y citotóxica (IC₅₀) del extracto hexánico pudieran explicarse debido a la composición química de dicho extracto. Diversos estudios se han llevado a cabo en relación a estas actividades biológicas los cuales han incluido a algunos de los fitoconstituyentes presentes en este extracto (Tabla 30). Según se aprecia en esta tabla, algunos de los compuestos del extracto hexánico tienen reportes de actividad citotóxica contra varias células cancerígenas incluidas en nuestro estudio, lo que explicaría que estos principios activos son los responsables de la actividad citotóxica de este extracto. En nuestro trabajo, los valores más bajos de IC₅₀ se obtuvieron para las líneas hepatocelulares HepG2 y Hep3B (IC₅₀ entre 27±3 y 39±3 µg/mL), convirtiéndolas en las más sensibles. Aunque estas líneas celulares difieren en cuanto a origen étnico, biología y genética, comparten los genes más frecuentemente mutados en el carcinoma

hepatocelular: p53 y β -catenina. p53 activa las enzimas de reparación del ADN, detención del ciclo celular y apoptosis. Por su parte, varios estudios sugieren que fitoesteroles y terpenos perturban el ciclo celular e inducen la apoptosis por la activación de las caspasas 3 y 9 en células cancerígenas. Al estar presentes estos fitocompuestos en los dos extractos orgánicos ensayados, pueden ser los responsables de la actividad citotóxica frente a líneas de cánceres hepatocelulares.^{128,129,130}

Tabla 30. Compuestos con actividad biológica identificados en extracto hexánico de las hojas de *C. incisa*

Compuesto	Bacterias /líneas celulares ensayadas	Ref.
Fitol	<i>P. aeruginosa</i>	121
	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	131
	MCF-7, PC-3, HeLa, HT-29, A-549, Hs294T	132
	A549 , L-132	133
	MCF-7	134
	Huh7, HepG2	135
β -Sitosterol	<i>S. pneumoniae</i>	136
	<i>P. aeruginosa</i>	137
	A549, PC3,MCF-7	138
	A549, L132, NCI-H460	139
	Caski, HeLa	140
α -Amirina	<i>S.aureus</i> , <i>B.cereus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i>	120
	<i>E.coli</i>	141
	PC3, Bcap-37, MGC-803	142
β -Amirina	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli.</i> , <i>B. cereus</i> , <i>E. cloacae</i>	143
	HeLa, MCF-7, Jurkat, HT-29	
	<i>S. aureus</i> , <i>B.subtilis</i> , <i>S. typhi</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i>	144
β -Amirona	<i>B. cereus</i>	
	MCF-7	145

La baja actividad citotóxica de los extractos obtenida para la línea cancerígena de mama (MCF7), difiere del resultado obtenido por Vijayalakshmi *et al.*¹⁴⁶, quienes obtuvieron una potente actividad anticáncer con una IC₅₀ de 40 µg/mL para el extracto etanólico de las partes aéreas de *C. quadrangularis*. Previamente varios investigadores han reportado propiedades citotóxicas de extractos de varias especies de *Cissus*, con buenos y/o aceptables valores de IC₅₀. Para Bhujade *et al.*¹⁴⁷, el extracto hexánico de tallos de *C. quadrangularis*, presentó citotoxicidad frente a células de carcinoma humano de la piel (A431). Mengome *et al.*¹⁴⁸ demostraron que el extracto etanólico de tallos de *C. debilis* tuvo efecto antiproliferativo frente a células CaCo-2 de cáncer de colon, alcanzando IC₅₀ igual a 25 µg/mL. Por su parte, Tagne *et al.*¹⁴⁹ expusieron que el extracto metanólico de raíces de *C. populnea* tuvo valores de IC₅₀ mayores de 100 µg/mL frente a las líneas NCI-H460 (cáncer de pulmón), MCF7 (cáncer de mama), PC3 (cáncer de próstata) y HeLa (cáncer de cérvix).

Los extractos hexánico y cloroformo/metanol fueron más activos que el fármaco de referencia frente a las líneas de carcinomas hepatocelulares, no así para el resto de los tipos cancerosos estudiados. Es oportuno considerar que el Paclitaxel es un compuesto puro, un fármaco consolidado, usado específicamente en el tratamiento del cáncer de pulmón, ovario y mama, con una gran efectividad terapéutica debido a su alta actividad citotóxica para estos tipos de cánceres.¹⁵⁰ No así para el tratamiento de cánceres a nivel hepático, donde no está indicado por su baja actividad.

En artículo publicado por la *American Association for Cancer Research*, se sugiere realizar los estudios de toxicidad *in vitro* de un régimen farmacológico en el mismo tipo de líneas celulares al cáncer en estudio. Esto para dar alguna indicación de la selectividad del tratamiento farmacológico para el tipo de cáncer particular que se está estudiando.¹⁵¹

En base a lo anterior, en nuestro estudio, sólo fue posible determinar el IS para las líneas de carcinomas hepatocelulares. Se ha reportado que un valor de IS inferior a 2 puede indicar una toxicidad general de un extracto o un compuesto puro.¹⁵² En nuestro caso, obtuvimos un IS superior a 2 para el extracto CHCl₃/MeOH frente a HepG2 (IS=2.21) y Hep3B (IS=2.77), superando los valores del Paclitaxel, que alcanzó IS de 1.24 y 2.41 frente a las mismas líneas celulares, respectivamente (Tabla 29). Estos resultados indican mayor selectividad en la acción citotóxica del extracto CHCl₃/MeOH en las células cancerosas que en las normales.

Se ha dado a conocer en la literatura que las especies del género *Cissus* son seguras para el ser humano. En estudio reciente publicado en el 2017, por Chipiti *et al.*⁵⁵, demostraron que el extracto etanólico de hojas de *C. cornifolia* no causó ninguna disminución significativa en la viabilidad de células embrionarias de riñón humano HEK 293 en todas las concentraciones probadas (50-200 µg/mL) obteniendo IC₅₀ de 100 µg/mL.

El resultado obtenido para el extracto acuoso (IC₅₀>100 µg/mL) frente a las células sanas, puede considerarse un precedente para el uso seguro en la medicina tradicional al ser la decocción y la infusión las formas generalizadas de uso de plantas medicinales. No obstante, investigaciones recientes apuntan a que las pruebas de toxicidad de cualquier tratamiento nuevo deberán realizarse en modelos animales, ya que esa es actualmente la única forma de evaluar la toxicidad general de los organismos. esto sólo debe hacerse con aquellos regímenes farmacológicos que han demostrado ser exitosos en las pruebas con la línea celular *in vitro* apropiada, posiblemente seguidas por pruebas limitadas de modelos animales.¹⁵¹

5.2.2.2 Actividad citotóxica e índice de selectividad de los compuestos

Del total de compuestos identificados ó aislados de las hojas de *C. incisa*, solamente nueve fueron ensayados para esta actividad biológica. Tal y como se ha expuesto anteriormente, a varios de los fitocompuestos hallados en la especie de estudio les han sido determinadas sus propiedades farmacológicas, específicamente, su actividad citotóxica frente a disímiles líneas celulares de cáncer. Como consecuencia, y en aras de ahorrar recursos y tiempo de investigación, sólo fueron evaluados los compuestos para los que no se tenían reportes previos. Estos fueron: β -sitosterol (CIH-2), acetato de β -sitosterilo (CIH-2Ac), α -amirina, tetracosanoato de 2,3-dihidroxipropilo (CIH-7), glucósido de β -sitosterol (CIH-8), β -D-tetraacetil glucopiranósido de β -sitosterilo (CIH-8Ac), cerebrosidos (CIH-10), α -amirina-3-*O*-glucopiranósido (CIH-11), tetraacetil 3-*O*- β -D-glucopiranósido de α -amirina (CIH-11Ac) y CIH-13Ac.

En la tabla Tabla 31 se muestran los resultados de la actividad citotóxica de los fitoconstituyentes reportados por otros investigadores, así como los obtenidos en este estudio. Para una mejor comprensión, se resaltan en color rojo los valores obtenidos para *C. incisa*.

Conforme a los criterios del Instituto Nacional del Cáncer de los EUA, un compuesto es considerado activo si tiene una $IC_{50} \leq 4 \mu\text{g/mL}$ sobre células tumorales.¹²⁶ De acuerdo a lo reportado, ninguno de los compuestos evaluados tuvo una buena actividad anticancerígena. No obstante, de nuestros resultados, el β -D-tetraacetil glucopiranósido de β -sitosterilo resultó ser el más activo alcanzando valores de $IC_{50} = 43 \pm 4 \mu\text{g/mL}$ frente a la línea cancerígena PC3 y $49.0 \pm 4 \mu\text{g/mL}$ frente a Hep3B.

Por su parte, las líneas celulares que más se inhibieron por la acción de los compuestos fueron la PC3 y la Hep3B, coincidiendo esta última con los resultados alcanzados para los

extractos hexánico y $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$. Los buenos resultados obtenidos particularmente frente a la línea celular Hep3B, se presentan muy alentadores. Este resultado es coincidente con el trabajo de Shen *et al.*, en el que se obtuvieron buenos resultados al ensayar triterpenos y glucósidos frente a dos líneas celulares de cáncer: una hepatocelular y una gástrica, por inducción de apoptosis. Al establecer la relación estructura-actividad, estos autores concluyeron que el hidroxilo o el monosacárido en la posición C3, hidroxilo en C19, o conjugación con doble enlace de C12-C13, los compuestos muestran una mejor actividad citotóxica contra las dos líneas celulares.¹⁵³ En un estudio realizado por Maiyo *et al.*¹³⁰, se aisló el glucósido de β -sitosterol, que fue ensayado frente a varias líneas celulares de cáncer, obteniéndose una $\text{IC}_{50}=251 \text{ } \mu\text{g/mL}$ para HepG2. Este resultado no supera al nuestro, donde exhibimos, además, mejores cifras de IC_{50} para su derivado tetraacetilado. Además de la posibilidad de que los productos naturales puedan convertirse en futuras plataformas para fármacos anticancerosos, una de sus aplicaciones en el tratamiento del cáncer es como adyuvante. Cerebrósidos aislados de *Hericium erinaceus* mostraron efecto inhibitorio sobre la angiogénesis y la reducción de la nefrotoxicidad inducida por Cisplatino.¹⁵⁴ Otros estudios con productos naturales han demostrado efectos sinergistas de la combinación con quimioterápicos.¹⁵⁵

Ninguno de los compuestos ensayados fue más activo que el control Paclitaxel. Respecto a la selectividad en las líneas de carcinomas hepatocelulares, los valores de IS alcanzados son mayores que 1, lo cual los hace más selectivos para las células tumorales, aún con su baja acción citotóxica. El β -D-tetraacetil glucopiranosido de β -sitosterilo obtuvo mejores valores de IC_{50} y de IS para ambas líneas, sin superar al Paclitaxel.

Tabla 31. Actividad citotóxica de productos naturales y derivados semisintéticos de las hojas de *C. incisa*. IC₅₀ (µg/mL)

Compuestos ^a Líneas celulares	HepG2		Hep3B		Hela		A549		PC3		MCF7		IHH
	IC ₅₀	IS	IC ₅₀	IS	IC ₅₀	IS	IC ₅₀	IS	IC ₅₀	IS	IC ₅₀	IS	IC ₅₀
Fitol	26.68 ¹³⁵	NR	ND	-	4.59± 0.76 ¹⁵⁶	NR	16.88±2.68 ¹⁵⁶ 20.98±0.32 ¹³³	NR	23.07±1.93 ¹⁵⁶	NR	2.60±0.41 ¹⁵⁶ 125.0 ¹³⁴	NR	NR
CIH-2	12 ± 2 ¹⁵⁷ 271.2±5.3 ¹⁵⁸	NR	>20 ¹⁵⁹	NR	8.29 ¹⁴⁰	NR	>100 ¹⁶⁰ 169.7±4.1 ¹⁵⁸	NR	164.1±5.1 ¹⁵⁸	NR	6.2 ±2.0 ¹⁵⁷ 15.4±2.1 ¹⁵⁸	NR	100
CIH-2Ac	57.62 ¹⁶¹	NR	77.0±5	1.3	87.0±4	ND	>100	ND	79.0±8	ND	ND	ND	100
α-amirina	70.0±5	1.43	83.0±8	1.2	>100	ND	>100 ¹⁶⁰	NR	>62.5 ¹⁶²	NR	>200 ¹⁶³	NR	100
β-amirina	206 x10 ³ (130) 281.3±14.3 ¹⁵⁸	NR	NR	-	>60 ¹⁴³	NR	>100 ¹⁶⁰ 74.2 ± 2.2 ¹⁶⁴ 157.6±5.6 ¹⁵⁸	NR	70.1 ± 2.4 ¹⁶⁴ 170.7±3.4 ¹⁵⁸	NR	10.1±1.8 ¹⁵⁸ 34.1 ±1.9 ¹⁶⁴	NR	ND
CIH-7	75.0±6	1.33	73.0±7	1.37	82.0±8	ND	>100	ND	75.0±5	ND	ND	ND	100
CIH-8	251 x10 ³ (130) 182.6±2.6 ¹⁵⁸	NR	55.0±5	-	>60 ¹⁴³	NR	95.19 ¹³⁸ 187.6±5.69 ¹⁵⁸	NR	53.0±4		8.52 ¹⁴³ 11.3±1.7 ¹⁵⁸	NR	NR
CIH-8Ac	50.0±3	1.56	49.0±4	1.59	63±7	ND	87±8	ND	43±4	ND	ND	ND	78±7

NR: los datos no están reportados en los artículos correspondientes, ND: No se determinó

^a: CIH-2=β-sitosterol, CIH-2Ac=acetato de estigmasta-5-en-3-β-ilo, CIH-7= tetracosanoato de 2,3-dihidroxiopropilo, CIH-8=glucósido de β-sitosterol, CIH-8Ac=β-D-tetraacetyl glucopiranosido de β-sitosterilo

Tabla 31. Actividad citotóxica de productos naturales y derivados semisintéticos de las hojas de *C. incisa*. IC₅₀ (µg/mL).

Continuación

Compuestos ^a Líneas celulares	HepG2		Hep3B		Hela		A549		PC3		MCF7		IHH
	IC ₅₀	IS	IC ₅₀	IS	IC ₅₀	IS	IC ₅₀	IS	IC ₅₀	IS	IC ₅₀	IS	IC ₅₀
CIH-10	>100	ND	>100	ND	>100	ND	>100	ND	>100	ND	>100	ND	>100
CIH-11	>100	ND	>100	ND	>100	ND	>100	ND	>100	ND	>100	ND	>100
CIH-11 Ac	>100	ND	>100	ND	>100	ND	>100	ND	>100	ND	>100	ND	>100
CIH-13 Ac	>100	ND	>100	ND	>100	ND	>100	ND	>100	ND	>100	ND	>100
Paclitaxel	64 x10 ⁻³	1.24	33 x10 ⁻³	2.41	4.78 x 10 ⁻³	ND	5.12 x 10 ⁻³	ND	10.2 x 10 ⁻³	ND	4.27 x 10 ⁻³	ND	79.4x 10 ⁻³

NR: los datos no están reportados en los artículos correspondientes, ND: No se determinó

^a: CIH-10=mezcla de cerebrósidos; CIH-11=glucósido de α -amirina, CIH-11Ac=tetraacetil 3-O- β -D-glucopiranosido de α -amirina, CIH-13Ac=mezcla de ceramidas acetiladas

5.3 Determinación del mecanismo de acción del compuesto más activo

De los resultados obtenidos en los ensayos biológicos, **CIH-13** fue el de mejor actividad antibacteriana al alcanzar una CMI de 50 µg/mL frente a *A. baumannii* resistente a carbapenémicos. Al ser CIH-13 una mezcla de ceramidas naturales, se escogió la estructura del compuesto mayoritario para ser incluido en los estudios computacionales.

5.3.1 Modelo computacional predictivo

Un modelo PTMLIF (Perturbation-Theory-Machine-Learning-Information) es útil si se trata de un estudio con múltiples parámetros farmacológicos para una serie de compuestos en diferentes proteínas diana, organismos de ensayo, líneas celulares, *etc.* En el trabajo actual, se desarrolló el primer modelo PTMLIF para la actividad antibacteriana, teniendo en cuenta los MRN_s de las bacterias y las secuencias de proteínas. Se descargó un conjunto de datos de ensayos preclínicos de la base de datos ChEMBL. Dicho conjunto de datos consta de 356 609 casos, e incluye diferentes actividades biológicas, líneas celulares, proteínas diana, organismos de ensayo, *etc.* La Tabla 32 muestra los resultados para el mejor modelo PTMLIF obtenido. En esta tabla se presentan los resultados generales para los subconjuntos de entrenamiento y validación. El modelo presentado tiene altos valores de *especificidad* (Sp)= 81.30%, *sensibilidad* (Sn)= 80.07% y *precisión general* (Ac)= 80.64%, en series de entrenamiento. Además, el modelo muestra valores similares de Sn, Sp y Ac en series de validación externa. Según lo informado por Hill y Lewicki¹⁶⁵, utilizamos la estrategia paso a paso de la selección de variables para detectar las perturbaciones más importantes en diferentes condiciones.

Tabla 32. Resultados del modelo y variables de entrada analizadas

Conjuntos observados ^a	Parámetros ^b	Valores obtenidos	Conjuntos predichos	
			f(v _{ij}) _{pred} =-1	f(v _{ij}) _{pred} = 1
Series de entrenamiento				
f(v _{ij}) _{obs} = -1	Sp	81.30	100241	23052
f(v _{ij}) _{obs} = 1	Sn	80.07	28738	115425
Total	Ac	80.64		
Series de validación				
f(v _{ij}) _{obs} = -1	Sp	81.17	33470	7762
f(v _{ij}) _{obs} = 1	Sn	80.11	9530	38390
Total	Ac	80.60		

^a Los tipos de clasificación son fármacos con efecto biológico más fuertes que el promedio. ($f(v_{ij})_{obs} = 1$ cuando $v_{ij} < \text{cutoff}^*$ y $f(v_{ij})_{obs} = -1$ a la inversa.

^b Sp = especificidad, Sn = sensibilidad, y Ac = precisión. * Se consideró cutoff = 100.

Es importante mencionar que los valores obtenidos se encuentran en el rango considerado como útil para los modelos de clasificación con aplicación en Química Médica. La ecuación del modelo obtenido es la siguiente:

(6)

$$f(v_{ij})_{calc} = -3.641 + 7.005 \cdot f(v_{ij})_{expt} + 72.89 \cdot \text{DSh}_0(\text{ALOGP})_{c2} \\ - 21.94 \cdot \text{DSh}_0(\text{PSA})_{c2} - 64.147 \cdot \text{DSh}_0(\text{ALOGP})_{c8} \\ + 25.780 \cdot \text{DSh}_0(\text{PSA})_{c9} + 23.513 \cdot \text{DSh}_2(\text{MRN})_{c1} - 28.998 \cdot \text{DSh}_2(\text{MRN})_{c3} \\ - 0.034 \cdot \text{DSh}_2(\text{PROT})_{c2}$$

$$n = 356609 \quad \chi^2 = 156192.33 \quad p < 0.05$$

Donde:

$f(v_{ij})_{expt}$ Valor esperado de la actividad biológica

$\text{DSh}_k(\text{ALOGP})_{cj}$, $\text{DSh}_k(\text{PSA})_{cj}$ Se refieren a la variabilidad en la información de la estructura química de los fármacos en términos de lipofilia expresada como ALOGP o área de superficie

	expresada como PSA para las diferentes condiciones c_j
$DSh(MRN)_{c_j}$	Explica la variabilidad de la información sobre la estructura de las MRN para las diferentes condiciones c_j
$DSh(Prot)_{c_j}$	Se refiere a la variabilidad en la información de las secuencias de proteínas para las diferentes condiciones c_j
n	Número de casos

El modelo comienza con el valor esperado de la actividad biológica e incorpora el efecto de diferentes perturbaciones en el sistema. Estas perturbaciones se expresan en términos de operadores PT. En consecuencia, el modelo tiene dos tipos de variables de entrada: la función de valor esperado, $f(\epsilon_{ij})_{\text{expt}}$ y los operadores PT. Los cuales son de diferentes tipos $f(v_{ij})_{\text{expt}}$, $Sh_k(\text{Drug}_i)$, $\Delta Sh_k(\text{Assay}_j)$, $\Delta Sh_k(\text{MRNs}_s)$, $\Delta Sh_k(\text{Prot})$.

La primera variable de entrada $f(v_{ij})_{\text{expt}}$ es el valor esperado de la actividad biológica para un compuesto en condiciones experimentales $c_j = (c_1, c_2, \dots)$. Los descriptores moleculares específicos fueron las entropías de Shannon de escala mínima-máxima utilizadas para medir la hidrofobicidad y las características del área de superficie polar del fármaco. Estas entradas pueden obtenerse a partir de los valores originales de LogP (coeficiente de partición n-octanol/agua) y PSA (área de superficie polar). Ambos valores se tomaron directamente del conjunto de datos ChEMBL.

5.3.1.1 Aplicación del modelo en la identificación de las dianas para CIH-13

Una vez obtenido el mejor modelo predictivo, se prepararon las condiciones para evaluar su aplicabilidad. Se introdujo el código SMILES del compuesto seleccionado (**CIH-13-II**) con lo cual se pudo ejecutar el programa DRAGON para calcular los descriptores moleculares de dicho compuesto. De igual forma se calcularon los operadores (variables) correspondientes y se sustituyeron en el modelo, ejecutándolo. Como resultado, se

obtuvieron valores de $f(\epsilon_{ij})_{\text{calc}}$ para cada parámetro de actividad biológica. De su interpretación podemos concluir las ventajas y desventajas del modelo para predecir la actividad del compuesto en esas condiciones, así como tener la predicción de la actividad de la ceramida sobre determinada bacteria y además cuales proteínas blanco son afectadas. Los resultados se muestran en la Tabla 33 (se seleccionaron algunos ejemplos debido al gran volumen de la base de datos). Según los resultados que arroja el modelo, la ceramida actúa mayoritariamente sobre bacterias Gram-negativas. De esta forma, observamos que hay concordancia entre los ensayos computacionales y experimentales. Por otro lado, el modelo está prediciendo actividad sobre otras cepas patógenas, como *M. tuberculosis*, lo cual constituye un aporte ya que ésta no se ensayó experimentalmente. La ceramida en estudio también exhibe una acción específica en bacterias, pero no se descarta que pueda afectar células eucariotas.

Un resultado importante es que el compuesto actúa fundamentalmente sobre proteínas situadas en la membrana plasmática y en el periplasma. Algunas de sus dianas están involucradas en la biosíntesis de peptidoglucano, otras como las beta-lactamasas están identificadas como mecanismos de resistencia bacteriana, lo cual resulta interesante para el desarrollo de fármacos antibacterianos.

Una información extra que brinda la Tabla 33 es que el modelo obtenido predice eficazmente para ensayos de actividad antibacteriana (por los valores positivos de CMI obtenidos), por el contrario, no será tan útil para predicciones de otros ensayos biológicos, por los valores negativos de IC_{50} .

Tabla 33. Algunos resultados del modelo predictivo para la ceramida en estudio

Código Proteína PDB ^a	Nombre	Microorganismo	Taxonomía	Enzima	Función/ubicación ^a	CMI*	IC ₅₀ *	CMI ₅₀ ^{b*}
P16897	Betalactamasa PSE-4	<i>P. aeruginosa</i>	Sólo bacterias	Beta-lactamasa	Hidroliza tanto la carbenicilina como la oxacilina	1.23	-3.82	1.03
P24735	Betalactamasa	<i>P. aeruginosa</i>	Sólo bacterias	Beta-lactamasa	Periplasma	1.37	-3.68	1.17
P0AD65	Peptidoglucano D, D-transpeptidasa MrdA	<i>E. coli</i>	Sólo bacterias	Proteína de unión a penicilina-2	Está involucrada en la biosíntesis de peptidoglucano	1.43	-3.62	1.23
Q9F663	Beta-lactamasa hidrolizante de carbapenem KPC-2	<i>K. pneumoniae</i>	Sólo bacterias	Beta-lactamasa	Hidroliza carbapenems, penicilinas, cefalosporinas y monobactams	1.48	-1.47	1.28
Q51504	Peptidoglucano D, D-transpeptidasa FtsI	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Sólo bacterias	Proteína de unión a penicilina-3	Está involucrada en la biosíntesis de peptidoglucano	1.20	-3.85	1.00
Q50575	Pirazinamidasas/nicotinamidasas PncA	<i>M. tuberculosis</i>	Sólo bacterias	Hidrolasa	Actividad hidrolasa	1.37	-3.68	1.17
P0AES4	Subunidad A de la ADN girasa	<i>E. coli</i>	Sólo bacterias	ADN topoisomerasa	Citoplasma	1.38	-3.67	1.18
P9WJM9	Cadena alfa de triptófano sintasa	<i>M. tuberculosis</i>	Bacterias y virus	Transferasa	Citoplasma/membrana plasmática	1.55	-3.51	1.35

PDB^a: Protein Data Bank, CMI₅₀^b: Concentración mínima del antibiótico capaz de reducir en un 50% el número de colonias en un cultivo control, *: en (µg/mL)

5.3.2 Docking molecular

Entre los resultados que obtuvimos en el modelado matemático se encuentran que la ceramida ejerce su actividad antibacteriana predominantemente sobre dianas que pueden encontrarse en el espacio periplásmico y/o en la membrana plasmática de bacterias Gram-negativas. En base a esto, y a los resultados experimentales se realizó el docking de la misma ceramida seleccionada, solamente para *A. baumannii*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, y *K. pneumoniae* las mismas que se ensayaron experimentalmente. El límite para las interacciones estables se consideró en $-7.0 \text{ kcal/mol}^{81}$, por lo cual las interacciones por debajo de esta cifra son las más estables. Sobre esta base, se obtuvieron interacciones destacables ligando-proteína para los patógenos ensayados.

Es necesario destacar que los resultados se basan en el primer conformero de acoplamiento. El ligando interacciona en regiones diferentes y configuraciones diferentes pero el primer conformero que se muestra es el mejor (más estable).

En la Tabla 34 se muestran las interacciones de la ceramida con *E. coli*, siendo la mejor interacción aquella con una proteína de membrana cuyo valor de energía de afinidad fue de -9.3 kcal/mol . A continuación, la Tabla 35 refleja las interacciones destacables ligando-proteína para *K. pneumoniae*, resultando en este caso la de una enzima oxidorreductasa con $EA = -7.6 \text{ kcal/mol}$. Para *P. aeruginosa* (Tabla 36), su interacción más estable fue con una proteína de transporte (8.1 kcal/mol). Por último, la Tabla 37 muestra las interacciones del compuesto en estudio con *A. baumannii*, encontrando la mejor interacción con una proteína de unión a ADN.

Del análisis de las Tablas 34-37 queda demostrado que la ceramida interacciona con proteínas localizadas en las membranas celulares de las bacterias Gram-negativas ensayadas *in silico*, entre las que se destacan interacciones con proteínas oxidorreductasas,

de membrana, de transporte, así como de señalización en diferentes procesos celulares. Destacando que la mejor interacción observada fue la de la ceramida con *E. coli*, al presentar energía de afinidad igual a -9.3 kcal/mol. Mientras que la menor interacción arrojada según la EA fue con *A. baumannii* (-6.9 kcal/mol), a pesar de que fue nuestra cepa más sensible en los ensayos biológicos.

Las Figuras 105, 106 y 107 muestran imágenes de docking, únicamente para la mejor interacción seleccionada para cada patógeno.

Tabla 34. Interacciones destacables ligando-proteína para *E. coli*

Dianas	Energía de Afinidad (kcal/mol)	Función
1t8z	-9.3	Proteína de membrana
4u4w	-8.7	Proteína de transporte
3e3c	-8.6	Proteína de unión a lípidos
2ovs	-8.6	Regulación genética
2f1v	-8.5	Proteína de membrana
1xa3	-8.5	Transferasa
2iwv	-8.4	Canal iónico
1fdo	-8.2	Oxidoreductasa
1ggh	-8.2	Oxidoreductasa
2hg2	-8.1	Oxidoreductasa
1njk	-8	Función desconocida
5c6p	-8	Proteína de transporte
2fzn	-8	Oxidoreductasa
1x2g	-8	Ligasa
4ixm	-7.9	Hidrolasa
1x06	-7.9	Transferasa
5n6l	-7.8	Transferasa
5unh	-7.8	Proteína de señalización
1kvu	-7.8	Isomerasa
1jyh	-7.8	Función desconocida

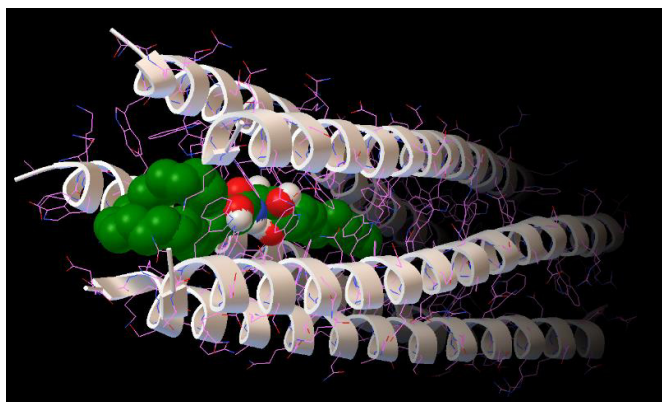


Figura 105. Imagen de docking ceramida- *E. coli* (1t8z)

Tabla 35. Interacciones destacables ligando-proteína para *K. pneumoniae*

Diana	Energía de Afinidad (kcal/mol)	Función
4osg	-7.6	Oxidoreductasa
2bi8	-7.5	Isomerasa
3qok	-7.3	Hidrolasa
5iv9	-7.3	Proteína de transporte
3rp7	-7.2	Oxidoreductasa
6fkt	-7	Oxidoreductasa
1zc2	-7	Hidrolasa
3kyb	-6.9	Isomerasa
3gfy	-6.9	Proteína de señalización de hidrolasa
4wd7	-6.9	Proteína de membrana
3int	-6.8	Isomerasa
2wu0	-6.8	Hidrolasa
5hft	-6.7	Transferasa
4wd8	-6.6	Proteína de membrana
1geg	-6.6	Oxidoreductasa
2zyg	-6.6	Oxidoreductasa
1niq	-6.5	Enlace a proteínas
2g2w	-6.4	Hidrolasa
6d xp	-6.4	Oxidoreductasa
5nwt	-6.4	Transferasa

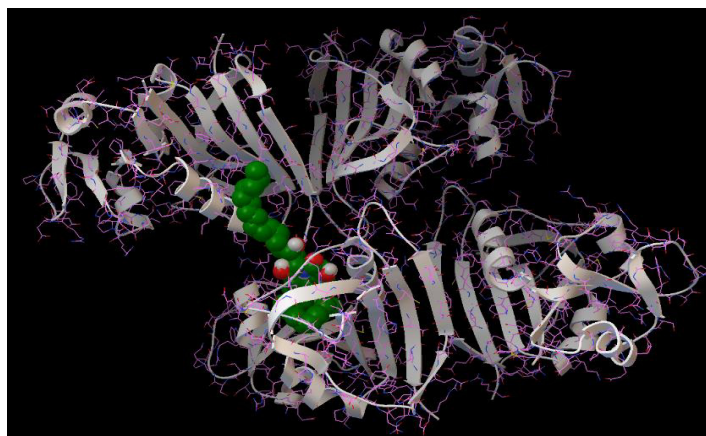


Figura 106. Imagen de docking ceramida-*K. pneumoniae* (4osg)

Tabla 36. Interacciones destacables ligando-proteína para *P. aeruginosa*

Diana	Energía de Afinidad (kcal/mol)	Función
3mom	-8.1	Proteína de transporte
3lt5	-7.7	Oxidoreductasa
1rpn	-7.6	Liasa
5h7z	-7.5	Inhibidor de hidrolasa
3s6l	-7.5	Oxidoreductasa
3f79	-7.5	Proteína de señalización
1ulz	-7.4	Liasa
5fp2	-7.4	Transporte metálico
2w76	-7.3	Receptor
2w6u	-7.3	Proteína de membrana
5odw	-7.3	Transporte de proteínas
2fe7	-7.3	Genómica estructural (desconocida)
4kqr	-7.2	Proteína biosintética
4zu2	-7.2	Hidrolasa
4b8u	-7.2	Liasa
4b7x	-7.2	Oxidoreductasa
5xhl	-7.2	Proteína de transporte
3wfb	-7.2	Sistema inmune/oxidoreductasa
4g32	-7.2	Oxidoreductasa

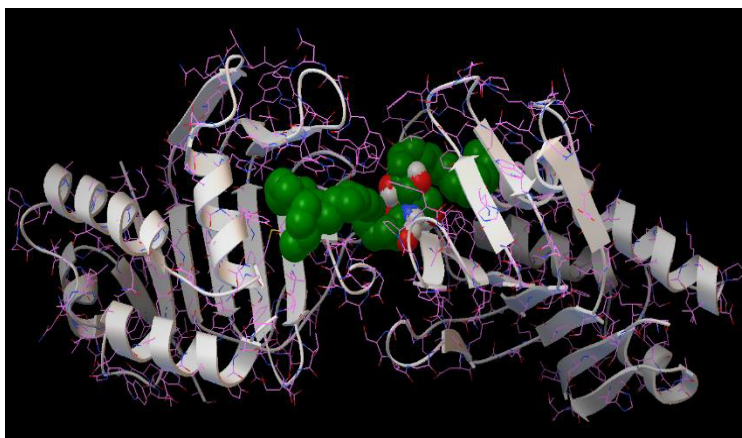


Figura 107. Imagen de docking ceramida-*P. aeruginosa* (3mom)

Tabla 37. Interacciones destacables ligando-proteína para *A. baumannii*

Dianas	Energía de Afinidad (kcal/mol)	Función
4pbb	-6.9	Proteína de unión a ADN
6fqa	-6.6	Adhesión celular
4rc9	-6.5	Liasa
3pud	-6.5	Liasa
5x47	-6.3	Liasa
5b6p	-6.2	Liasa
5wrf	-6.2	Liasa
4e75	-6.1	Transferasa
3tak	-6.1	Liasa
5yhm	-6.1	Liasa
4ob9	-6.1	Liasa
6eus	-6	Proteína de membrana
4rhc	-6	Liasa
5yol	-6	Transferasa
5yl5	-5.9	Liasa
4lj2	-5.8	Liasa
5h7x	-5.8	Transferasa
4j2o	-5.8	Isomerasa
4o90	-5.8	Liasa
5dl5	-5.8	Proteína de membrana

5.3.3 Ensayo de liberación de contenidos vesiculares

De acuerdo a los resultados que se muestran en la Figura 108 se concluye que **CIH-13** produjo liberación de los contenidos vesiculares de los liposomas LUV, al observar un aumento de la fluorescencia de la sonda en el tiempo. La liberación fue lenta, aumentando gradualmente en el tiempo. Prácticamente no se observó liberación en los primeros 90 minutos después de la adición del compuesto. Este resultado concuerda con los obtenidos por un estudio en sistemas LUV. En dicho estudio Montes *et al.*¹⁶⁶, estudiaron el flujo de salida de la membrana inducido ya sea por ceramidas generadas *in situ* (a través de la escisión enzimática de la esfingomielina) o por la adición de ceramidas (C16) a membranas preformadas.

El efecto obtenido de las ceramidas sobre el sistema de membranas está relacionado con su concentración. Tal y como se aprecia en la Figura 109 el mejor resultado se obtuvo para la mayor concentración (13.6 μM).

Estudios previos han planteado dos mecanismos por los cuales las ceramidas modifican la barrera de permeabilidad de las membranas celulares. El mecanismo de reestructuración de dos capas, que puede permitir incluso el paso de macromoléculas, y su tendencia a formar dominios ricos en ceramidas. El primero se le atribuye a la geometría de la ceramida, pues facilita las transiciones lamelar a hexagonal en las bicapas lipídicas. Dichas transiciones se localizan en ciertos puntos de la membrana, y pueden permitir una comunicación extensa entre los compartimentos interno y externo. Incluso la “propensión” de la bicapa para adoptar la forma hexagonal es suficiente para desestabilizar transitoriamente la bicapa.¹⁶⁷ En el estudio de Montes *et al.*¹⁶⁶ está claramente respaldado el papel de la geometría de la ceramida en la promoción del flujo de salida.

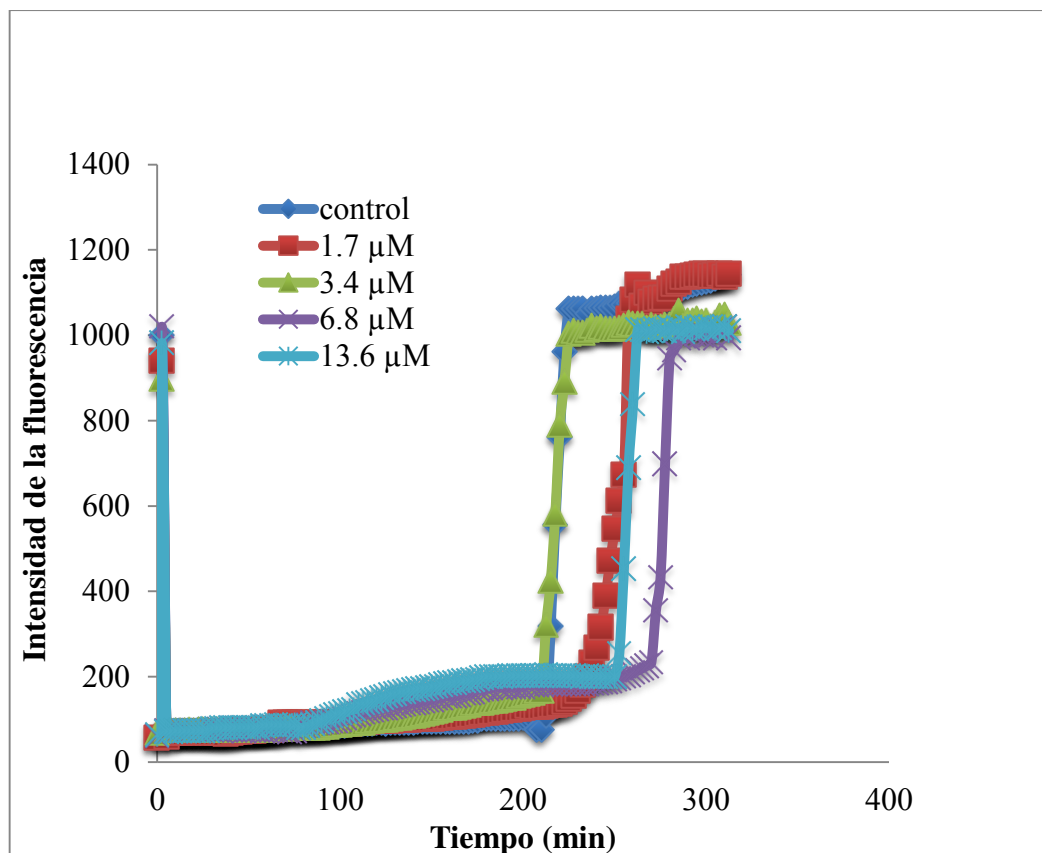


Figura 108. Eflujo de ANTS-DPX inducido por la acción de **CIH-13**

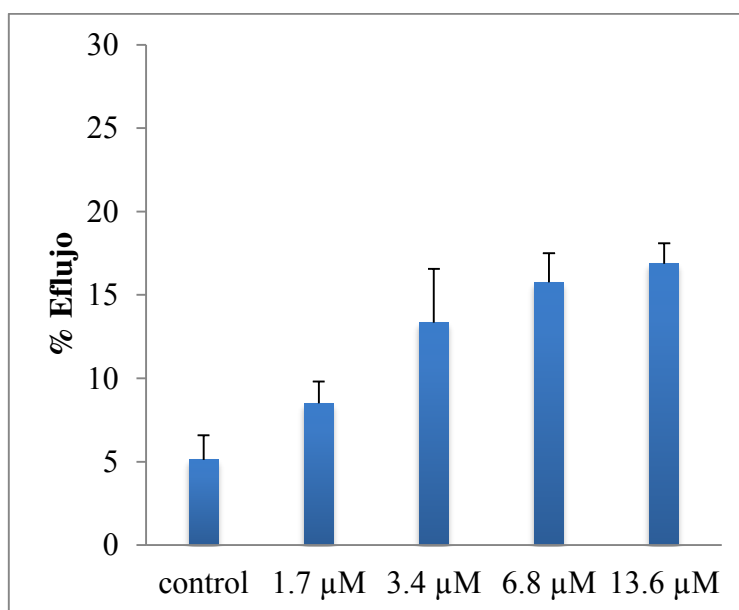


Figura 109. CIH-13 induce un eflujo concentración-dependiente de solutos encapsulados en LUVs

La segregación lateral de los dominios ricos en ceramida en el plano de la membrana es otro mecanismo importante que explica el flujo de salida. El fenómeno fue observado por primera vez por Huang *et al.*¹⁶⁸ y luego se informó, sobre la base de diferentes técnicas, por Holopainen *et al.*^{169,170}, Carrer y Maggio¹⁷¹, y Veiga *et al.*¹⁷²

A 37 °C, los dominios ricos en ceramida constituyen islas rígidas en un mar de lípidos fluidos. La coexistencia de dominios ordenados y desordenados es una condición que permite que se produzca el flujo de salida.¹⁶⁶ Las interfases entre las regiones ricas en ceramida y las regiones pobres dan lugar a la liberación observada de contenidos de los liposomas.

De los resultados de nuestros ensayos queda esbozado un posible mecanismo de acción para el compuesto más activo de la actividad antibacteriana. La segregación lateral de dominios ricos en ceramida y la tendencia de ésta a inducir fases lipídicas no lamelares pueden explicar conjuntamente la reestructuración de las bicapas y, por ende, el flujo de solutos hacia el exterior. No es la primera vez que mezclas de esfingolípidos son evaluados en ensayos biológicos. Zhang *et al.*¹⁰⁹ estudiaron la capacidad neuritogénica, mientras que Bano *et al.*¹⁰⁰ evaluaron la actividad nematocida, en ambos casos de mezclas de ceramidas naturales. En nuestro caso particular sería muy importante la evaluación de los compuestos de CIH-13 de forma independiente, pues los resultados obtenidos en nuestra investigación sientan un precedente: la actividad antibacteriana, y su acción principalmente a nivel de membrana, la convierte en un interesante candidato para el desarrollo de antibióticos. Especialmente si su mayor efecto fue frente a *A.baumannii*, un conocido patógeno nosocomial, y teniendo en cuenta que la insaturación en $\Delta 8$ que presenta CIH-13, está ausente en las ceramidas de los mamíferos. Lo anterior la coloca en posición aventajada

para ser considerada en estudios donde pueda actuar en combinación con un antibacteriano ya establecido y con mecanismo de acción diferente, con la proyección de que sus efectos indeseables serían pocos para el ser humano. De esta forma, nuestro trabajo estaría aunando el camino en la lucha contra las infecciones producidas por bacterias Gram-negativas, las cuales reportan altos índices de resistencia a los actuales regímenes de tratamiento.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

1. Del extracto hexánico se identificaron 17 compuestos, entre ellos 9 alcanos: heneicosano, tetracosano, pentacosano, hexacosano, heptacosano, octacosano, nonacosano, triacontano, hentriacontano; 6 terpenos: *cis* y *trans*- fitol, β -amirina, cicloursanol, α -amirina, β -amirona; un esterol: β -sitosterol y una cetona: 6, 10, 14-trimetil-2-pentadecanona. Siendo el compuesto más abundante el β -sitosterol.
2. Del extracto cloroformo/metanol se aislaron y caracterizaron: el β - sitosterol (**CIH-2**); tetracosanoato de 2,3-dihidroxiopropilo (**CIH-7**); β -D-glucopiranosido de β -sitosterol (**CIH-8**); α - amirina-3-*O*-glucopiranosido (**CIH-11**); y 2-(2'-hidroxidecanoil amino)-1,3,4-hexadecanotriol-8-eno (**CIH-15**), así como las mezclas de hidrocarburos alifáticos (**CIH-1**), alcohol y epóxido (**CIH-3**), triterpenoides (**CIH-5**), ceramidas (**CIH-13**) y cerebrósidos (**CIH-10**).
3. Nuestro estudio constituye la primera caracterización de las ceramidas **CIH-13** (**I, II, IV**), **CIH-15**, y de los cerebrósidos **CIH-10** (**IV, V**); así como de sus respectivos derivados acetilados.
4. Es el primer reporte en el género *Cissus* del cicloursanol, del tetracosanoato de 2,3-dihidroxiopropilo (**CIH-7**); de 2-(2'-hidroxidecanoil amino)-1,3,4-hexadecanotriol-8-eno (**CIH-15**), así como de las ceramidas **CIH-13**, y cerebrósidos **CIH-10**.
5. Los extractos hexánico y cloroformo/metanol fueron los que mostraron actividad contra los nueve aislados clínicos de bacterias resistentes (CMI 125-500 $\mu\text{g/mL}$).

6. El extracto hexánico mostró la mejor actividad antimicobacteriana contra la cepa multifarmacorresistente de *M. tuberculosis* G122 con una CMI de 125 µg/mL.
7. El compuesto más activo del extracto hexánico fue el fitol frente a *E. faecium* resistente a vancomicina y *A. baumannii* resistente a carbapenémicos, con CMI=100 µg/mL en ambos casos.
8. El compuesto más activo del extracto cloroformo/metanol fue la mezcla de ceramidas (**CIH-13**) frente a la bacteria resistente *A. baumannii* resistente a carbapenémicos (CMI=50 µg/mL).
9. El extracto hexánico fue el más citotóxico frente a HepG2 y Hep3B ($IC_{50} \leq 30$ µg/mL).
10. De todos los compuestos ensayados el más citotóxico fue el β -D-tetraacetyl glucopiranosido de β -sitosterilo frente a PC3 ($IC_{50} = 43 \pm 4$ µg/mL).
11. Un posible mecanismo de acción que justifica la actividad de **CIH-13** involucra la unión de estas ceramidas a las membranas bacterianas, formando poros, causando la muerte del patógeno.
12. Se acepta la hipótesis propuesta en este estudio porque varios productos naturales de las hojas de *C. incisa* presentaron actividad antibacteriana, y el más activo, un mecanismo de acción diferente a uno de los fármacos de referencia (levofloxacin).
13. Se justifica el uso tradicional de *C. incisa* en la medicina tradicional mexicana, sin embargo, se necesitarían estudios *in vivo* para confirmar seguridad y eficacia de la planta.

CAPÍTULO 7

PERSPECTIVAS

1. Realizar el estudio químico biodirigido del extracto hexánico de *C. incisa* hojas contra la cepa MFR *M. tuberculosis* G122.
2. Realizar el estudio químico biodirigido del extracto hexánico de *C. incisa* hojas contra las células cancerosas hepatocelulares HepG2 y Hep3B.
3. Aislar los compuestos de CIH-13 y evaluar su actividad antibacteriana, de forma independiente.
4. Realizar estudios de sinergia de los compuestos aislados de CIH-13, con diferentes antibióticos frente a cepas multifármacorresistentes para evaluar si aumenta la actividad antibacteriana de estos fármacos.
5. Aislar los cerebrósidos de CIH-10 y evaluar su efecto inhibitorio sobre la angiogénesis y la reducción de la nefrotoxicidad inducida por fármacos contra el cáncer.
6. Realizar reacciones de derivatización de los dobles enlaces en ceramidas y cerebrósidos para confirmar químicamente la ubicación inequívoca de sus dobles enlaces.

CAPÍTULO 8

BIBLIOGRAFÍA

1. Alós, J. I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 33, 692–699 (2015).
2. OMS/ Enfermedades infecciosas. WHO (2019). Disponible en: http://www.who.int/topics/infectious_diseases/es/. (Consultado: 5 Marzo 2019)
3. Nii-Trebi, N. Emerging and Neglected Infectious Diseases: Insights, Advances, and Challenges. *Biomed Res Int.* 1–15 (2017).
4. Janeway, C., Travers, P. and Walport, M. Infectious agents and how they cause disease. in *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. (Garland Science, 2001).
5. Zumla, A. Host-directed therapies for infectious diseases: current status, recent progress, and future prospects. *Lancet Infect Dis.* 16, 47–63 (2016).
6. Betancor, L., Gadea, M. y Flores, K. Genética bacteriana. in *Temas de Bacteriología y Virología Médica* 59–80 (2006).
7. Somogyi, T., Alfaro, W., Herrera, M. L. y Herrera, J. F. Infecciones del tracto respiratorio: etiología bacteriana y viral en una población pediátrica. *Rev. Médica del Hosp. Nac. Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera* 33, 5–18 (1998).
8. Fisher, R., Gollan, B. and Helaine, S. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nat Rev Microbiol.* 15, 453–464 (2017).
9. Organización Mundial de la Salud. Una atención más limpia es una atención más segura. Disponible en: www.who.int/gpsc/background/es/. (Consultado: 5 marzo 2019).

10. OMS. Prevención de las infecciones nosocomiales: Guía Práctica. 2, 70 (2002).
11. Maguiña Vargas, C. Infecciones nosocomiales. *Acta Med Perú.* 33, 175–177 (2016).
12. Soto-Estrada, G., Moreno-Altamirano, L. y Pahua Díaz, D. Panorama epidemiológico de México, principales causas de morbilidad y mortalidad. *Rev Fac Med* 59, 8–22 (2016).
13. Boev, C. and Kiss, E. Hospital-Acquired Infections. Current Trends and Prevention. *Crit Care Nurs Clin North Am.* 29, 51–65 (2017).
14. Peleg, A. and Hooper, D. C. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. *N Engl J Med* 362, 1804–1813 (2010).
15. WHO. The top 10 causes of death. (2018). Disponible en: www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death. (Consultado: 12 marzo 2019)
16. Ferreira-Guerrero, E., Baez-saldaña, R. y Trejo-Valdivia, B. Salud pública de México. *Salud Publica Mex* 55, 307–313 (2013).
17. WHO. Infection prevention and control. The burden of health care-associated infection worldwide. Disponible en: [/www.who.int/infection-prevention/publications/burden_hcai/en/](http://www.who.int/infection-prevention/publications/burden_hcai/en/). (Consultado: 11 marzo 2019)
18. Goodman, L.S and Gilman, A. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Mc Graw Hill (2012).
19. Perez Montoya, L. H., Zurita Villarroel, I. y Pérez Rojas, N. Infecciones Intrahospitalarias: Agentes, Manejo Actual y Prevención Nosocomial. *Rev. Ciencias Médicas* 13, 90–94 (2010).
20. Sultan, I., Rahman, S., Jan, A. T. and Siddiqui, M. T. Antibiotics, Resistome and Resistance Mechanisms: A Bacterial Perspective. *Front. Microbiol* 9, (2018).

21. Munita, J. M. and Arias, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr* 4, 1–37 (2016).
22. WHO. WHO publishes the list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. *WHO* (2017). Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/>. (Consultado: 11 marzo 2019)
23. Vignoli, R. y Seija, V. Principales mecanismos de resistencia antibiótica. in *Temas de Bacteriología y Virología médica* 649–662 (Departamento de Bacteriología y Virología, 2006). doi:10.1016/0008-8846(90)90046-Z
24. Global Tuberculosis Report 2018. *Geneva: World Health Organization* (2018). Disponible en: www.who.int/tb/publications/global_report/en/. (Consultado: 13 marzo 2019)
25. OMS. Tuberculosis. Nota descriptiva. Enero 2018. Disponible en: <http://origin.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>. (Consultado: 15 abril 2018)
26. Tratamiento para la enfermedad de tuberculosis. *Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades* (2016). Disponible en: <https://www.cdc.gov/tb/esp/topic/treatment/tbdisease.htm>. (Consultado: 5 noviembre 2018)
27. Silva, C., Bermúdez, V., Arraiz, N. and Bermúdez, F. Fármacos de primera línea utilizados en el tratamiento de la tuberculosis. *Arch. Venez. Farmacol. y Ter.* 26, (2007).
28. World Health Organization. Cancer. *World Health Organization* (2019). Disponible en: <https://www.who.int/cancer/en/>. (Consultado: 14 marzo 2019)
29. Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J. and Jemal, J. L. A. Global cancer

- statistics. *Cancer Cytopathol.* 65, 87–108 (2015).
30. Lazcano-Ponce, E., Mohar-Betancourt, A., Meneses-García, A. and Hernández-Ávila, M. Cancer burden in Mexico: Urgent challenges to be met. *Salud Publica Mex* 58, 101–103 (2016).
 31. INEGI. *Estadísticas a propósito del... día mundial contra el cáncer* (4 de febrero). (2018).
 32. NIH-National Cancer Institute. Cancer Treatment. (2019). Disponible en: www.cancer.gov/about-cancer/treatment. (Consultado: 14 marzo 2019)
 33. American Society of Clinical Oncology (ASCO). Cancer. (2018). Disponible en: <https://www.cancer.net/es/desplazarse-por-atención-del-cáncer/cómo-se-trata-el-cáncer/quimioterapia/qué-es-la-quimioterapia>. (Consultado: 6 Abril 2019)
 34. Kim, C. and Kim, B. Anti-cancer natural products and their bioactive compounds inducing ER stress-mediated apoptosis: A review. *Nutrients* 10, 1–29 (2018).
 35. Kroschinsky, F., Stölzel, F., Bonin, S. von, Beutel, G. and Kochanek, M. New drugs, new toxicities: severe side effects of modern targeted and immunotherapy of cancer and their management. *Crit. Care* 21, 89 (2017).
 36. Gegechkori, N., Haines, L. and Lin, J. Long-Term and Latent Side Effects of Specific Cancer Types. *Med. Clin. North Am.* 101, 1053-1073 (2017).
 37. Goyal, S., Gupta, N. and Chatterjee, S. Natural Plant Extracts as Potential Therapeutic Agents for the Treatment of Cancer. *Curr. Top. Med. Chem* 17, 96–106 (2017).
 38. Cree, I. A. and Charlton, P. Molecular chess? Hallmarks of anti-cancer drug resistance. *BMC Cancer* 17, 1–8 (2017).
 39. Lei, M. Dual-functionalized liposome by co-delivery of paclitaxel with sorafenib

- for synergistic antitumor efficacy and reversion of multidrug resistance. *Drug Deliv.* 26, 262–272 (2019).
40. Cary, D. and Peterlin, B. M. Natural Products and HIV/AIDS. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 34, 31–38 (2018).
 41. Camacho-Corona, M. D. R., García, A., Mata-Cárdena, B. D., Garza-González, E. Screening for antibacterial and antiprotozoal activities of crude extracts derived from mexican medicinal plants. *African J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 12, 104–112 (2015).
 42. Vega-Ávila, E., Velasco-Lezama, R. and Jiménez-Estrada, M. Las plantas como fuente de compuestos antineoplásicos. Revisión. *Bioquímica* 31, 97–111 (2006).
 43. Newman, D. J., Cragg, G. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod* 79, 629–661 (2016).
 44. Speck-Planche, A. and Cordeiro, M. N. D. S. Computer-Aided Discovery in Antimicrobial Research: In Silico Model for Virtual Screening of Potent and Safe Anti-Pseudomonas Agents. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 18, 305–314 (2015).
 45. Lo, Y.-C., Rensi, S., Torn, W. and Altman, R. Machine learning in chemoinformatics and drug discovery. *Drug Discov. Today* 23, 1538–1546 (2018).
 46. Kontoyianni, M. Docking and Virtual Screening in Drug Discovery. in *Proteomics for Drug Discovery* (eds. Laza, I. M., Kontoyianni, M. & Lazar, A. C.) 1647, 255–266 (Humana Press, 2017).
 47. Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett.* 8, 102 (2013).

48. Diaz, J. Análisis de productos cosméticos mediante técnicas nanoscópicas (SPM). *Nutr. Clin. Pract.* 319, 5–17 (2011).
49. Gómez Bilbao, G. Adenilato ciclasa de Bordetella pertussis estudio de su interacción con membranas. (Universidad del País Vasco - Euskal Herriko Unibertsitatea, 2009).
50. Jiménez Silva, A. A. Medicina tradicional. Boletín CONAMED-OPS (2017).
51. Científicos de Yucatán hallan esencia para tratar cáncer y VIH. Periódico Milenio. Disponible ent: <http://sipse.com/milenio/cientificos-de-yucatan-hallan-esencia-para-tratar-cancer-y-vih-92074.html>. (Consultado: 10 septiembre 2017)
52. Laza Loaces, D., Rodríguez Luis, I. and Sardiña Cabrera, G. Descubrimiento y desarrollo de agentes anticancerígenos derivados de plantas medicinales. *Rev. Cuba. Plantas Med* 8, (2003).
53. Fernandes, G. and Banu, J. Medicinal properties of plants from the genus *Cissus*: A review. *J. Med. Plants Res.* 6, 3080–3086 (2012).
54. Ndhlovu, D. N. and Masika, P. J. In Vitro Efficacy of Extracts from plants used by Small-Holder Farmers in the Treatment of Dermatophilosis in Cattle. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 14, 263–272 (2017).
55. Chipiti, T., Ibrahim, M. A., Singh, M. and Islam, M. S. In vitro α -amylase and α -glucosidase Inhibitory and Cytotoxic Activities of Extracts from *Cissus cornifolia* Planch Parts. *Pharmacogn. Mag* 13, S329–S333 (2017).
56. Kumar, M., Talreja, T., Jain, D. and Dhuria, R. K. Comparative evaluation of in vitro antibacterial activity of several extracts of *Achyranthes aspera*, *Azolla pinnata*, *Cissus quadrangularis* and *Tinospora cordifolia*. *Int. J. Chem. Stud.* 5, 154–157 (2017).

57. Fouche, G. Acaricidal activity of the organic extracts of thirteen South African plants against *Rhipicephalus* (Boophilus) *decoloratus* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 224, 39–43 (2016).
58. Parameshwar, H., Rehman, F., Nidsanametla, S. and Technological, J. N. Screening of antinociceptive activity on butanol. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* 5, 966–978 (2016).
59. Pereira Beserra, F. *Cissus sicyoides*: Pharmacological mechanisms involved in the anti-inflammatory and antidiarrheal activities. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 1–15 (2016).
60. Sharma, A. and Patel, V. K. In Vitro Screening of the Antibacterial Activity and Identification of Bioactive Compounds from Plants against Selected *Vibrio* Spp. Pathogens. *Turk J Biol* 33, 137–144 (2009).
61. Yi-Jie, L. Anti-inflammatory polyphenol constituents derived from *Cissus pteroclada* Hayata. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 26, 3425–3428 (2016).
62. Musa, A. M. A New Antimicrobial Prenylated Benzo-lactone from the Rhizome of *Cissus cornifolia*. *Pharmacognosy Res* 7, 363–6 (2015).
63. Sani, Y. M. Isoliquiritigenin and β -sitosterol from *Cissus polyantha* Tuber Glig and Brandt. *J. Med. Plants Res* 9, 918–921 (2015).
64. *Cissus incisa*. Learn2Grow Magazine (2016). Disponible en: <http://www.learn2grow.com/plants/cissus-incisa/>. (Consultado: 5 septiembre 2016)
65. SEINet. *Cissus trifoliata*. (2019). Disponible en: <http://swbiodiversity.org/seinet/taxa/index.php?taxon=3579>. (Consultado: 14 agosto 2019)
66. Alvarado Vázquez, M. A., Rocha Estrada, A. y Moreno Limón, S. *De la lechuguilla*

a las biopelículas vegetales: las plantas útiles de Nuevo León. (2010).

67. Gruenstaeudl, M. Native Plants: An Introduction to the Flora of Central Texas. (2009). Disponible en: www.bio.utexas.edu/courses/bio406d/images/pics/vit/cissus_incisa.htm. (Consultado: 18 marzo 2019)
68. Favela, J. M. Aislamiento y Caracterización de los compuestos Antibacterianos y Antituberculosos de *Larrea Tridentata*, determinación de su Toxicidad y Mecanismo de Acción del Compuesto más activo. (Universidad Autónoma de Nuevo León, 2012).
69. Zgoda, J. R. and Porter, J. R. A Convenient Microdilution Method for Screening Natural Products Against Bacteria and Fungi. *Pharm. Biol.* 39, 221–225 (2001).
70. Franzblau, S. G. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *J. Clin. Microbiol.* 36, 362–366 (1998).
71. Camacho-Corona, M. del R. Activity against drug resistant-tuberculosis strains of plants used in Mexican traditional medicine to treat tuberculosis and other respiratory diseases. *Phytother. Res.* 22, 82–85 (2008).
72. Basu, A., Kousuke Saito, M. and Ratna B, K. Stellate cell apoptosis by a soluble mediator from immortalized human hepatocytes. *Apoptosis* 11, 1391–1400 (2006).
73. Badisa, R. B. Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. *Anticancer Res.* 29, 2993–2996 (2009).
74. Bediaga, H., Arrasate, S. and González-Díaz, H. PTML Combinatorial Model of ChEMBL Compounds Assays for Multiple Types of Cancer. *ACS Comb. Sci.* 20, 621–632 (2018).

75. González-Díaz, H. ANN multiscale model of Anti-HIV drugs activity vs AIDS prevalence in the US at county level based on information indices of molecular graphs and social networks. *J. Chem. Inf. Model.* 54, 744–755 (2014).
76. H. Jeong, Tombor, B., Albert, R., Oltvai, Z. N. and Barabási, A.-L. The large-scale organization of metabolic networks. *Nature* 760, 651–654 (2000).
77. Martínez, S. G., Tenorio-Borroto, E., Pliego, A. B., Diaz-Albiter, H. and Vazquez-Chagoyan, Juan C. Gonzalez-Diaz, H. PTML Model for Proteome Mining of B-cell Epitopes and Theoretic- Experimental Study of Bm86 Protein Sequences from Colima Mexico. *J. Proteome Res.* 14, 1–27 (2017).
78. Trott, O. and Olson, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J Comput Chem.* 31, 455–461 (2011).
79. O’Boyle, N. Open Babel: An open chemical toolbox. *J. Cheminform.* 3, 1–14 (2011).
80. Morris, G. M. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J Comput Chem.* 30, 2785–2791 (2010).
81. Chang, M. W., Lindstrom, W., Olson, A. J. and Belew, R. K. Analysis of HIV Wild-Type and Mutant Structures via in Silico Docking against Diverse Ligand Libraries. *J. Chem. Inf. Model* 47, 1258–1262 (2007).
82. Coutsiás, E. A., Seok, C. and Dill, K. E. N. A. Using quaternions to calculate RMSD. *J Comput Chem.* 25 (15), 1849-57 (2004).
83. Hope, M., Bally, M., Webb, G. and Cullis, P. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure: characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochim Biophys*

- Acta* 812, 55–65 (1985).
84. Fiske, C. H. and Subbarow, Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66, 375–400 (1925).
 85. Ellens, H., Bentz, J. and Szoka, F. H⁺- and Ca²⁺-induced fusion and destabilization of liposomes. *Biochemistry* 24, 3099–106. (1985).
 86. Pathomwachaiwat, T. Alkaline phosphatase activity-guided isolation of active compounds and new dammarane-type triterpenes from *Cissus quadrangularis* hexane extract. *J. Ethnopharmacol.* 160, 52–60 (2015).
 87. Singaravadivel, C. Santhanaraj, K. J. Gas chromatography and mass spectroscopic determination of phytocompounds in *Cissus vitiginea* leaf. *Pharm. Lett.* 8, 292–297 (2016).
 88. Senthamil Selvan, P. and Velavan, S. Analysis of bioactive compounds in methanol extract of *Cissus vitiginea* leaf using GC-MS technique. *Rasayan J. Chem.* 8, 443–447 (2015).
 89. Sathish Kumar, T., Anandan, A. and Jegadeesan, M. Identification of chemical compounds in *Cissus quadrangularis* L. Variant-I of different sample using GC-MS analysis. *Arch. Appl. Sci. Res.* 4, 1782–1787 (2012).
 90. Bojaja, R. A. and Rosakutty, P. J. GC-MS analysis of methanol wild plant and callus extracts from three *Cissus* species, Family Vitaceae. *J. Chem. Pharm. Res.* 4, 3420–3426 (2012).
 91. Vishnuthari, N. and Sripathi, S. K. GC-MS Analysis of hexane extract of stems and roots of the ethnomedicinal plant *Cissus quadrangularis* Linn. *J. Chem. Biol. Phys. Sci.* 5, 3954–3963 (2015).
 92. Hernández-Galicia, E., Calzada, F., Roman-Ramos, R. and Alarcón-Aguilar, F. J.

- Monoglycerides and fatty acids from *Ibervillea sonora* root: Isolation and hypoglycemic activity. *Planta Med.* 73, 236–240 (2007).
93. Hisashi, K. and Noriko, S. Sterol Glucosides from *Prunella vulgaris*. *Phytochemistry* 29, 2351–2355 (1990).
 94. Yang, A. M., Li, H., Liu, J. L., Guo, W. J. and Wu, R. Chemical Constituents of *Euphorbia altotibetica*. *Adv. Mater. Res.* 634–638, 905–908 (2013).
 95. Njinga, N. S. Isolation and Antimicrobial Activity of β -Sitosterol-3-O-Glucoside from *Lannea Kerstingii* Engl. & K. Krause (Anacardiaceae). *Nitte Univ. J. Heal. Sci.* 6, 4–8 (2016).
 96. Peshin, T. and Kar, H. Isolation and Characterization of β -Sitosterol-3-O- β -D-glucoside from the Extract of the Flowers of *Viola odorata*. *Br. J. Pharm. Res.* 16, 1–8 (2017).
 97. Kuppuramalingam, A. and B, R. Antioxidant activity of *Cissus quadrangularis* L. stem in-vitro. *World J. Pharm. Res* 7, 759–765 (2018).
 98. Chan, Y. Y. The constituents of the stems of *Cissus assamica* and their bioactivities. *Molecules* 23, 1–10 (2018).
 99. Kang, W. Y., Li, C. Q. and Ji, Z. Q. A new carbamic acid from *Dryopteris wallichiana*. *Chem. Nat. Compd.* 47, 91–93 (2011).
 100. Bano, S., Faizi, S., Lubna, Fayyaz, S. and Iqbal, E. Y. Isolation of Ceramides from *Tagetes patula* L. Yellow Flowers and Nematicidal Activity of the Fractions and Pure Compounds against Cyst Nematode, *Heterodera zae*. *Chem. Biodivers.* 16, (2019).
 101. Michaelson, L. V., Napier, J. A., Molino, D. and Faure, J. D. Plant sphingolipids: Their importance in cellular organization and adaption. *Biochim. Biophys. Acta*

- 1861, 1329–1335 (2016).
102. Wang, M. Y. The chemical constituents from *Urtica fissa* leaves. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 20, 709–718 (2018).
 103. Hussain, H. Melicimides A and B: Two new ceramides from stem bark of *Melicia excelsa*. *Rec. Nat. Prod.* 7, 141–146 (2013).
 104. Lynch, D. D. V and Dunn, T. M. T. An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function. *New Phytol.* 161, 677–702 (2004).
 105. Sugiyama, S., Honda, M., Higuchi, R. and Komori, T. Stereochemistry of the four diastereomers of ceramide and ceramide lactoside. *Liebigs Ann. der Chemie* 349–356 (1991). doi:10.1002/jlac.199119910161
 106. Tapondjou, L. A., Mitaine-offer, A.-C. and Sautour, M. Sphingolipids and other constituents from *Cordia platythyrsa*. *Biochem. Syst. Ecol.* 33, 1293–1297 (2005).
 107. Lü, J. L., Duan, J. A., Tang, Y. P. and Ge, Y. L. Two new ceramides from the radix of *Angelica sinensis*. *J. Chem. Res.* 658–661 (2008).
 108. Lin, W. Y., Yen, M. H., Teng, C. M., Tsai, I. L. and Chen, I. S. Cerebrosides from the rhizomes of *Gynura japonica*. *J. Chinese Chem. Soc* 51, 1429–1434 (2004).
 109. Zhang, W., Xu, J. and Zhang, X. Sphingolipids with neuritogenic activity from *Euphorbia sororia*. *Chem. Phys. Lipids* 148, 77–83 (2007).
 110. Inagaki, M. Isolation and structure of three new ceramides from the starfish *Acanthaster planci*. *European J. Org. Chem.* 1998, 129–131 (1998).
 111. Yu, J. S., Moon, E. and Kim, K. H. A new cerebroside from the twigs of *Lindera glauca* (Sieb. et Zucc.) Blume. *Bioorg. Chem.* 74, 122–125 (2017).
 112. Ling, T., Xia, T., Wan, X., Li, D. and Wei, X. Cerebrosides from the roots of

- Serratula chinensis*. *Molecules* 11, 677–683 (2006).
113. Scio, E., Mendes, R. F., Motta, E. V. S. and Bellozi, P. M. Q. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Some Plant Extracts. *Phytochemicals as Nutraceuticals – Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health* (In tech, 2012).
 114. Shoibe, M. In Vitro and in vivo biological activities of *Cissus adnata* (Roxb.). *Biomedicines* 5, 63 (2017).
 115. Arellanes, J., Adelina, M., Garrido, C. y Díaz, L. Las plantas medicinales mexicanas como fuente de compuestos antimicobacterianos. *Rev. Mex. Ciencias Farm.* 41, 22–29 (2010).
 116. Lee, C. R. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. *Front Cell Infect Microbiol.* 7, (2017).
 117. Mohamed, G. A., Abd-elrazek, A. E. E., Hassanean, H. A., Youssef, D. T. A. and Soest, R. Van. New compounds from the Red Sea marine sponge *Echinoclathria gibbosa*. *Phytochem. Lett.* 9, 51–58 (2014).
 118. Morad, S. A. F. et al. Role of P-glycoprotein inhibitors in ceramide-based therapeutics for treatment of cancer. *Biochem Pharmacol.* 130, 21–33 (2017).
 119. Vázquez, L. H., Palazon, J. & Navarro-ocaña, A. The pentacyclic triterpenes α , β amyrins: A review of sources and biological activities. In *Intechopen* 426, 487–502 (2011).
 120. Abreu, V. G. C. Evaluation of the bactericidal and trypanocidal activities of triterpenes isolated from the leaves, stems, and flowers of *Lychnophora pinaster*. *Brazilian J. Pharmacogn.* 21, 615–621 (2011).
 121. Lee, W., Woo, E. R. and Lee, D. G. Phytol has antibacterial property by inducing

- oxidative stress response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Free Radic. Res.* 50, 1309–1318 (2016).
122. Mouts, A., Vattulainen, E. and Matsufuji, T. On the importance of the C (1) -OH and C(3) -OH functional groups of the long-chain base of ceramide for interlipid interaction and lateral segregation into ceramide-rich domains. *Langmuir* 1–27 (2018). doi: 10.1021/acs.langmuir.8b03237.
 123. Brown, P. and Dawson, M. J. A perspective on the next generation of antibacterial agents derived by manipulation of natural products. *Progress in Medicinal Chemistry* 54, (Elsevier B.V., 2015).
 124. García, E. H. Aislamiento, caracterización estructural y determinación de las propiedades antibacterianas de los constituyentes de los frutos de *Acacia farnesiana*. (Universidad Autónoma de Nuevo León, 2017).
 125. Medicina, F. Bacterias Gram negativas Parte 1. Microbiología. (2017). Disponible en:
www.fmed.uba.ar/depto/.../Seminario_3_Bacteriología_2°_Cuatrimestre_2017.
(Consultado: 13 Junio 2018)
 126. Suffness M and Pezzuto, J. Assays related to cancer drug discovery. in *Methods in Plant Biochemistry: assays for bioactivity* (ed. (ed.), H. K.) 71–133 (Academic Press, London, 1990).
 127. Moo-Puc, R., Robledo, D. and Freile-Peigrín, Y. In vitro cytotoxic and antiproliferative activities of marine macroalgae from Yucatán, Mexico. *Ciencias Mar.* 35, 345–358 (2009).
 128. Guo-hua, Q., Xiaojin, X. and Fang, X. Distinctive pharmacological differences between liver cancer cell lines HepG2 and Hep3B. *Cytotechnology* 67, 1–12

(2015).

129. Tovar, V., Villanueva, A. and Llovet, J. M. Cell biology and genetics in liver cancer. *Gastroenterol. Hepatol.* 30, 360–369 (2007).
130. Maiyo, F., Moodley, R. and Singh, M. Phytochemistry, cytotoxicity and apoptosis studies of β -Sitosterol-3-O- Glucoside and β -Amyrin from *Prunus africana*. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 13, 105–112 (2016).
131. Saikia, D., Parihar, S. and Chanda, D. Antitubercular potential of some semisynthetic analogues of phytol. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20, 508–512 (2019).
132. Pejin, B., Kojic, V. and Bogdanovic, G. An insight into the cytotoxic activity of phytol at in vitro conditions. *Nat Prod Res.* 28, 2053–2056 (2014).
133. Sakthivel, R., Malar, D. S. and Devi, K. P. Phytol shows anti-angiogenic activity and induces apoptosis in A549 cells by depolarizing the mitochondrial membrane potential. *Biomed. Pharmacother.* 105, 742–752 (2018).
134. Sheeja, L., Lakshmi, D., Bharadwaj, S. and Sajidha Parveen, K. Anticancer activity of phytol purified from *Gracilaria edulis* against human breast cancer cell line (MCF-7). *Int. J. Curr. Sci.* 19, 36–46 (2016).
135. Kim, C. Activation of caspase-9 / 3 and inhibition of epithelial mesenchymal transition are critically involved in antitumor effect of phytol in hepatocellular carcinoma cells. *Phytother Res.* 7, 1026–1031 (2015).
136. Li, H. β -sitosterol interacts with pneumolysin to prevent *Streptococcus pneumoniae* infection. *Sci. Rep.* 5, 1–9 (2015).
137. Rasamiravaka, T. Terpenoids from *Platostoma rotundifolium* (Briq.) A. J. paton alter the expression of quorum sensing-related virulence factors and the formation of biofilm in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1–22 (2017).

138. Rajavel, T., Mohankumar, R., Archunan, G., Ruckmani, K. and Devi, K. P. Beta sitosterol and Daucosterol (phytosterols identified in *Grewia tiliaefolia*) perturbs cell cycle and induces apoptotic cell death in A549 cells. *Sci. Rep.* 7, 1–15 (2017).
139. Rajavel, T., Packiyaraj, P., Suryanarayana, V. and Kumar, S. β -Sitosterol targets Trx/Trx1 reductase to induce apoptosis in A549 cells via ROS mediated mitochondrial dysregulation and p53 activation. *Sci. Rep.* 8, 1–15 (2018).
140. Cheng, D., Guo, Z. and Zhang, S. Effect of β -sitosterol on the expression of HPV E6 and p53 in cervical carcinoma cells. *Contemp Oncol.* 19, 36–42 (2015).
141. Broniatowski, M., Flasiński, M., Wydro, P. and Fontaine, P. Grazing incidence diffraction studies of the interactions between ursane-type antimicrobial triterpenes and bacterial anionic phospholipids. *Colloids Surf B Biointerfaces* 1, 561–567 (2015).
142. Luo, H., Cai, Y., Peng, Z., Liu, T. and Yang, S. Chemical composition and in vitro evaluation of the cytotoxic and antioxidant activities of supercritical carbon dioxide extracts of pitaya (dragon fruit) peel. *Chem. Cent. J.* 8, 1–7 (2014).
143. Yessoufou, K., Elansary, H. O., Mahmoud, E. A. and Skalicka-Woźniak, K. Antifungal, antibacterial and anticancer activities of *Ficus drupacea* L. stem bark extract and biologically active isolated compounds. *Ind. Crops Prod.* 74, 752–758 (2015).
144. Abdel-Raouf, N. Antibacterial β -amyrin isolated from *Laurencia microcladia*. *Arab. J. Chem.* 8, 32–37 (2015).
145. Shan, L. Y. Cytotoxic, Antibacterial and antioxidant activity of triterpenoids from *Kopsia singaporensis* Ridl. *J. Chem. Pharm. Res.* 6, 815–822 (2014).
146. Vijayalakshmi, A., Kumar, P. R., Sakthi Priyadarsini, S. and Meenaxshi, C. In vitro

- antioxidant and anticancer activity of flavonoid fraction from the aerial parts of *Cissus quadrangularis* Linn., against human breast carcinoma cell lines. *J. Chem.* 2013, (2013).
147. Bhujade, A., Gupta, G., Talmale, S., Das, S. K. and Patil, M. B. Induction of apoptosis in A431 skin cancer cells by *Cissus quadrangularis* Linn stem extract by altering Bax-Bcl-2 ratio, Release of Cytochrome from Mitochondria and PARP cleavage. *Food Funct.* 4, 338–346 (2013).
 148. Line-Edwige, M., Raymond, F. Tchouya G., François, E. and Edouard, N.-E. Antiproliferative effect of alcoholic extracts of some Gabonese medicinal plants on human colonic cancer cells. *African J. Tradit. Complement. Altern. Med* 6, 112–117 (2009).
 149. Tagne, R. S. Anticancer and antioxidant activities of methanol extracts and fractions of some Cameroonian medicinal plants. *Asian Pac. J. Trop. Med* 7, S442–S447 (2014).
 150. Priyadarshini, K. and Keerthi Aparajitha, U. Paclitaxel against cancer: A short review medicinal chemistry. *Med. Chem* 2, 139–141 (2012).
 151. Wilding, J. L. and Bodmer, W. F. Cancer cell lines for drug discovery and development. *Cancer Res.* 74, 2377–2384 (2014).
 152. Sahli, R. Antiproliferative and antibacterial activities of *Cirsium scabrum* from Tunisia. *Complement. Altern. Med.* 25–33 (2017). doi:10.1155/2017/7247016
 153. Shen, S., Li, W., Ouyang, M. and Wang, J. Structure-activity relationship of triterpenes and derived glycosides against cancer cells and mechanism of apoptosis induction. *Nat. Prod. Res.* 32, 654–661 (2018).
 154. Lee, S. R. A new cerebroside from the fruiting bodies of *Hericium erinaceus* and

- its applicability to cancer treatment. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 25, 5712–5715 (2015).
155. Zong, L. Reversal of multidrug resistance in breast cancer cells by a combination of ursolic acid with doxorubicin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 165, 268–275 (2019).
 156. Pejin, B., Kojic, V. and Bogdanovic, G. An insight into the cytotoxic activity of phytol at in vitro conditions. *Nat. Prod. Res.* 28, 2053–2056 (2014).
 157. Shahat, A. A. Phytochemical profiling, antioxidant and anticancer activities of *Gastrocotyle hispida* growing in Saudi Arabia. *Acta Trop.* 191, 243–247 (2019).
 158. El-halawany, A. M., Osman, S. M. and Abdallah, H. M. Cytotoxic constituents from *Vicia monantha* subsp. *monantha* seeds. *Nat. Prod. Res.* 6419, 1–4 (2018).
 159. Yen, C. Indiosides G–K: Steroidal glycosides with cytotoxic and anti-inflammatory activities from *Solanum violaceum*. *J Nat Prod.* 75(4), 636–643 (2012).
 160. Ragasa, C. Y. and B. Cornelio, K. Triterpenes from *Euphorbia hirta* and their cytotoxicity. *Chinese J. Nat. Med* 11, 528–533 (2013).
 161. Sarg, T. M., Abbas, F. A., El-Sayed, Z. I. and Mustafa, A. M. Two new polyphenolic compounds from *Ficus retusa* L. ‘variegata’ and the biological activity of the different plant extracts. *J. Pharmacogn. Phytother.* 3, 89–100 (2011).
 162. Toze, F., Fomani, M., Nouga, A. B., Chouna, J. R. and Waffo, A. Taraxastane and lupane triterpenoids from the bark of *Manilkara zapota*. *Int. Res. J. Pure Appl. Chem.* 7, 157–164 (2015).
 163. El-alfy, T. S., Ezzat, S. M., Hegazy, A. K., Amer, A. M. M. and Kamel, G. M. Isolation of biologically active constituents from *Moringa peregrina* (Forssk) Fiori. (family: Moringaceae) growing in Egypt. *Pharmacogn. Mag.* 7, 109–116 (2011).

164. Tahsin, T., Wansi, J. D., Martin, C. and Sarker, S. D. Cytotoxic properties of the stem bark of *Citrus reticulata* blanco (Rutaceae). *Phytother Res.* 31, 1215–1219 (2017).
165. Hill, T. and Lewicki, P. *Statistics: methods and applications: a comprehensive reference for science, industry, and data mining.* (StatSoft, Inc, 2006). doi:10.1016 / B978-0-323-03707-5.50024-3
166. Montes, L. R., Ruiz-Argüello, M. B., Goñi, F. M. and Alonso, A. Membrane restructuring via ceramide results in enhanced solute efflux. *J. Biol. Chem.* 277, 11788–11794 (2002).
167. Ruiz-Argüello, M. B., Basáñez, G., Goñi, F. M. and Alonso, A. Different effects of enzyme-generated ceramides and diacylglycerols in phospholipid membrane fusion and leakage. *J. Biol. Chem.* 271, 26616–26621 (1996).
168. Huang, H., Goldberg, E. and Zidovetzki, R. Ceramide induces structural defects into phosphatidylcholine bilayers and activates phospholipase A2. *Biochem Biophys Res Commun.* 220, 834–838 (1996).
169. Holopainen, J., Lehtonen, J. and Kinnunen, P. Lipid microdomains in dimyristoylphosphatidylcholine-ceramide liposomes. *Chem Phys Lipids* 88, 1–13 (1997).
170. Holopainen, J., Brockman, H., Brown, R. and Kinnunen, P. Interfacial interactions of ceramide with dimyristoylphosphatidylcholine: impact of the N-acyl chain. *Biophys J.* 80, 765–775 (2001).
171. Carrer, D. and Maggio, B. Phase behavior and molecular interactions in mixtures of ceramide with dipalmitoylphosphatidylcholine. *J Lipid Res.* 40, 1978–1989 (1999).

172. Veiga, M., Arrondo, J., Goñi, F. and Alonso, A. Ceramides in phospholipid membranes: effects on bilayer stability and transition to nonlamellar phases. *Biophys J.* 76, 342–350 (1999).
173. Mahato, S. B. & Kundu, A. P. ^{13}C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids- a compilation and some salient features. *Phytochemistry* 37, 1517–1575 (1994).

APÉNDICE A

Datos espectroscópicos y espectrométricos adicionales de productos naturales y derivados semi-sintéticos de las hojas de *C. incisa*

Datos espectroscópicos de (24R)-estigmasta-5-en-3 β -ol

Posición	RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz)		RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz)	
	δ (ppm) Reportados ⁹³	δ (ppm) Obtenidos	δ (ppm) Reportados ⁹³	δ (ppm) Obtenidos
1			37.2	37.06
2			31.6	31.47
3	3.52(m)	3.54(m)	71.8	71.62
4			42.3	42.13
5			140.7	140.56
6	5.35(m)	5.38(m)	121.7	121.53
7			31.9	31.71
8			31.9	31.71
9			50.1	49.94
10			36.5	36.31
11			21.1	20.89
12			39.8	39.58
13			42.3	42.11
14			56.8	56.57
15			24.3	24.11
16			28.2	28.05
17			56.0	55.86
18	0.68(s)	0.7049(s)	11.9	11.66
19	1.01(s)	1.03(s)	19.4	19.20
20			36.1	35.95
21	0.92(d, <i>J</i> =6.5Hz)	0.95(d, <i>J</i> =6.56 Hz)	18.8	18.83
22			33.9	33.75
23			26.0	25.88
24			45.8	45.64
25			29.1	28.95
26	0.83(d, <i>J</i> =6.5Hz)	0.86(d, <i>J</i> =7.2 Hz)	19.8	19.62
27	0.81(d, <i>J</i> =6.5 Hz)	0.84(d, <i>J</i> =6.9 Hz)	19.0	18.58
28			23.0	22.87
29	0.84(t, <i>J</i> =7.5 Hz)	0.87(t, <i>J</i> =7.2 Hz)	12.0	11.78

Comparación de datos espectroscópicos de acetato de β -sitosterilo

Posición	RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) Reportados ⁹⁴	RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm) Obtenidos	RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) Reportados ⁹⁴	RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm) Obtenidos
1			36.9	37.00
2			29.0	28.26
3	4.62(m)	4.64(m)	73.7	74.00
4			38.1	38.13
5			139.7	139.67
6	5.36(t, $J= 5.4$ Hz)	5.40(m)	122.5	122.66
7			31.9	31.91
8			31.9	31.87
9			50.0	50.04
10			36.5	36.61
11			21.0	21.46
12			39.7	39.73
13			42.3	42.33
14			56.7	56.7
15			24.9	24.3
16			28.2	27.79
17			56.0	56.04
18	0.77(s)	0.70(s)	11.8	11.87
19	0.99(s)	1.04(s)	19.0	19.04
20			36.1	36.17
21	0.87(s)	0.94(d, $J= 6.24\text{Hz}$)	19.8	19.83
22			34.4	33.95
23			27.1	26.8
24			45.8	45.85
25			23.0	23.08
26		0.86(d, $J= 8.08\text{Hz}$)	19.3	19.32
27		0.84 (d, $J= 7.56 \text{ Hz}$)	29.6	29.16
28			18.7	18.74
29	0.84(t, $J= 6.6$ Hz)	0.87(t, $J= 7.84$ Hz)	11.9	12.00
<u>CH_3CO</u> <u>C=O</u>	2.04(s)	2.06(s)	170.9	21.04 170.56

Datos espectroscópicos ^{13}C de triterpenos pentacíclicos¹⁷³

Posición	β -amirina	germanicol	α -amirina	lupeol
1	38.7	38.5	38.7	38.7
2	27.3	27.4	27.2	27.4
3	79.0	79	78.3	78.9
4	38.8	39	38.7	38.8
5	55.3	55.7	55.2	55.3
6	18.5	18.3	18.3	18.3
7	32.8	34.7	32.9	34.2
8	38.8	40.8	40.0	40.8
9	47.7	51.3	47.7	50.4
10	37.6	37.3	36.9	37.1
11	23.6	21.2	23.3	20.9
12	121.8	26.2	124.3	25.1
13	145.1	39.0	139.3	38.0
14	41.8	43.4	42.0	42.8
15	26.2	27.6	28.7	27.4
16	27.0	37.7	26.6	35.5
17	32.5	34.4	33.7	43.0
18	47.4	142.8	58.9	48.2
19	46.9	129.8	39.6	47.9
20	31.1	32.3	31.2	150.9
21	34.8	33.4	41.5	29.8
22	37.2	37.4	28.1	40.0
23	28.2	28.0	15.6	28.0
24	15.5	15.4	15.6	15.4
25	15.6	16.1	15.6	16.1
26	16.9	16.7	16.8	15.9
27	26.0	14.6	23.3	14.5
28	28.4	25.3	28.1	18.0
29	33.3	31.3	17.4	109.3
30	23.7	29.2	21.3	19.3

CIH-13										1: TOF MS ES+									
PAT190213-63287-02 144 (1.608) AM (Cen,4, 80.00, Ar,10000.0,0.00,0.00); Cm (66:172-194:215)																			
No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC
1:	55.0560	2.30e4	0.36	0.07	59:	191.1807	2.90e4	0.46	0.09	117:	422.2953	2.73e4	0.43	0.09	118:	439.2830	2.18e4	0.34	0.07
2:	57.0719	1.16e4	0.34	0.07	60:	195.1686	2.79e4	0.44	0.09	119:	441.2985	6.33e5	100.00	19.93	120:	442.3016	1.35e5	21.33	4.25
3:	65.0403	3.09e4	0.49	0.10	61:	196.1460	3.58e4	0.57	0.11	121:	443.3051	1.95e5	3.08	0.61	122:	444.3075	2.46e4	0.39	0.08
4:	67.0556	1.86e4	0.29	0.06	62:	198.1866	3.76e4	0.59	0.12	123:	447.3447	2.17e4	0.34	0.07	124:	455.3146	5.85e4	0.92	0.18
5:	69.0713	4.03e4	0.64	0.13	63:	205.1959	2.68e4	0.42	0.08	125:	456.3183	1.56e4	0.25	0.05	126:	457.2725	5.75e4	0.91	0.18
6:	71.0871	2.85e4	0.45	0.09	64:	209.1914	1.56e4	0.25	0.05	127:	458.2747	1.73e4	0.27	0.05	128:	459.2862	3.46e4	0.55	0.11
7:	74.0980	1.85e5	2.92	0.58	65:	212.1195	4.45e4	0.70	0.14	129:	481.2926	1.57e4	0.25	0.05	130:	483.3193	4.03e4	0.64	0.13
8:	79.0554	1.53e4	0.24	0.05	66:	212.2013	3.89e4	0.61	0.12	131:	485.3203	1.57e4	0.25	0.05	132:	503.2968	1.54e4	0.24	0.05
9:	81.0709	5.37e4	0.85	0.17	67:	219.2121	2.73e4	0.43	0.09	133:	526.4329	2.02e4	0.32	0.06	134:	556.4424	2.02e4	0.32	0.06
10:	83.0868	6.23e4	0.98	0.20	68:	223.2070	1.75e4	0.28	0.06	135:	570.4578	4.01e4	0.63	0.13	136:	571.4619	1.54e4	0.24	0.05
11:	85.1023	2.19e4	0.35	0.07	69:	226.2176	4.50e4	0.71	0.14	137:	584.4732	2.27e4	0.36	0.07	138:	600.4658	2.81e4	0.44	0.09
12:	88.1137	2.53e4	0.40	0.08	70:	230.1665	2.12e4	0.33	0.07	139:	614.4841	5.05e4	0.80	0.16	140:	615.4874	2.08e4	0.33	0.07
13:	89.0610	5.65e4	0.89	0.18	71:	233.2273	2.35e4	0.37	0.07	141:	628.5005	2.52e4	0.40	0.08	142:	644.4950	3.00e4	0.47	0.09
14:	93.0349	6.99e4	1.10	0.22	72:	237.2219	1.87e4	0.29	0.06	143:	658.5104	5.03e4	0.79	0.16	144:	659.5137	2.17e4	0.34	0.07
15:	93.0707	2.94e4	0.46	0.09	73:	240.2332	4.52e4	0.73	0.15	145:	672.5271	2.54e4	0.40	0.08	146:	675.6761	4.14e4	0.65	0.13
16:	95.0866	6.65e4	1.05	0.21	74:	247.2435	2.39e4	0.38	0.08	147:	676.6796	2.05e4	0.32	0.06	148:	688.5215	2.72e4	0.43	0.09
17:	97.0664	2.24e4	0.35	0.07	75:	251.2386	1.92e4	0.30	0.06	149:	702.5359	4.12e4	0.65	0.13	150:	703.5398	1.76e4	0.28	0.06
18:	97.1022	7.16e4	1.13	0.23	76:	252.1717	1.77e4	0.28	0.06	151:	716.5521	2.06e4	0.32	0.06	152:	732.5469	2.00e4	0.31	0.06
19:	100.0769	2.22e4	0.35	0.07	77:	254.2491	5.07e4	0.80	0.16	153:	746.5619	3.25e4	0.51	0.10	154:	760.5784	1.54e4	0.26	0.05
20:	102.1291	9.78e4	1.54	0.31	78:	265.2535	1.89e4	0.30	0.06	155:	790.5898	2.31e4	0.36	0.07	156:	859.6061	1.35e5	2.13	0.42
21:	103.9571	7.91e4	1.25	0.25	79:	268.2645	5.16e4	0.81	0.16	157:	860.6098	8.04e4	1.27	0.25	158:	861.6126	2.55e4	0.40	0.08
22:	105.9552	3.84e4	0.61	0.12	80:	274.2754	1.92e4	0.30	0.06	159:	934.6409	3.21e4	0.51	0.10	160:	935.6425	2.03e4	0.32	0.06
23:	107.0667	3.51e4	0.55	0.11	81:	279.0848	9.90e4	1.56	0.31	161:	939.5948	3.21e4	0.51	0.10	162:	940.5989	2.03e4	0.32	0.06
24:	109.1021	5.52e4	0.87	0.17	82:	282.2804	5.13e4	0.81	0.16	163:	955.5689	4.55e4	0.72	0.14	164:	956.5726	2.83e4	0.45	0.09
25:	111.0448	2.25e4	0.36	0.07	83:	283.1765	2.02e4	0.32	0.06										
26:	111.0828	3.03e4	0.48	0.10	84:	293.2841	1.71e4	0.27	0.05										
27:	111.1175	5.05e4	0.80	0.16	85:	296.2957	2.93e4	0.46	0.09										
28:	114.0926	3.82e4	0.60	0.12	86:	301.1428	4.45e4	0.70	0.14										
29:	116.1445	5.49e5	8.65	1.72	87:	303.3056	4.18e5	6.60	1.32										
30:	117.1475	4.55e4	0.72	0.14	88:	304.3087	9.90e4	1.56	0.31										
31:	121.0296	1.42e5	2.24	0.45	89:	310.3111	5.58e4	0.88	0.18										
32:	121.1023	5.65e4	0.89	0.18	90:	311.3125	1.58e4	0.25	0.05										
33:	123.1178	3.97e4	0.63	0.12	91:	312.3270	7.81e4	1.23	0.25										
34:	125.1013	3.62e4	0.57	0.11	92:	313.3300	1.61e4	0.25	0.05										
35:	125.1336	2.87e4	0.45	0.09	93:	319.3005	1.99e4	0.31	0.06										
36:	128.1083	3.66e4	0.58	0.12	94:	321.3163	7.90e5	12.47	2.49										
37:	129.0557	3.37e4	0.51	0.11	95:	322.3197	1.78e5	2.81	0.56										
38:	130.1603	5.55e4	0.88	0.17	96:	323.3230	2.23e4	0.35	0.07										
39:	133.0868	7.20e4	1.14	0.23	97:	326.3792	1.01e5	1.60	0.32										
40:	135.1174	7.70e4	1.22	0.24	98:	327.2025	3.03e4	0.48	0.10										
41:	137.1327	3.52e4	0.56	0.11	99:	327.3827	2.44e4	0.39	0.08										
42:	139.1143	2.99e4	0.47	0.09	100:	338.3427	3.77e5	59.53	11.87										
43:	142.1236	3.31e4	0.52	0.10	101:	339.3462	7.57e5	11.95	2.38										
44:	148.1134	1.72e4	0.27	0.05	102:	340.3493	8.84e4	1.40	0.28										
45:	149.0248	1.02e6	16.08	3.21	103:	342.3733	1.73e4	0.27	0.05										
46:	149.1335	7.33e4	1.16	0.23	104:	360.3248	1.10e5	1.73	0.35										
47:	150.0279	7.83e4	1.24	0.25	105:	361.3276	2.74e4	0.43	0.09										
48:	151.1488	2.09e4	0.33	0.07	106:	371.2288	3.16e4	0.50	0.10										
49:	153.1288	2.16e4	0.34	0.07	107:	376.3171	1.79e4	0.28	0.06										
50:	156.1392	3.04e4	0.48	0.10	108:	383.2050	4.31e4	0.68	0.14										
51:	163.1492	5.13e4	0.81	0.16	109:	393.2979	4.85e5	7.34	1.46										
52:	167.1449	2.32e4	0.37	0.07	110:	394.3016	1.09e5	1.72	0.34										
53:	170.1552	3.11e4	0.49	0.10	111:	395.3053	2.00e4	0.32	0.06										
54:	175.0170	1.77e4	0.28	0.06	112:	406.2033	1.90e5	3.00	0.60										
55:	177.1132	3.22e4	0.51	0.10	113:	407.2065	5.52e4	0.87	0.17										
56:	177.1647	3.59e4	0.57	0.11	114:	413.2671	5.01e5	7.90	1.58										
57:	181.1603	1.65e4	0.26	0.05	115:	414.2703	1.25e5	1.99	0.40										
58:	184.1701	3.61e4	0.57	0.11	116:	415.2634	4.59e4	0.72	0.14										

Espectro numérico de CIH-13-I

CIH-13

PAT190213-63287-02 377 (4.188) AM (Cen,4, 80.00, Ar,10000.0,0.00,0.00); Cm (359:385-(398:423)-M18-BS2)														
No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC
1:	88.1136	1.24e5	2.22	0.77	101:	339.3462	7.57e5	11.95	2.38	117:	422.2953	2.73e4	0.43	0.09
2:	89.1163	6.30e3	0.11	0.04	102:	340.3493	8.84e4	1.40	0.28	134:	556.4424	2.02e4	0.32	0.06
3:	102.1302	1.45e4	0.26	0.09	103:	342.3733	1.73e4	0.27	0.05	136:	571.4619	1.54e4	0.24	0.05
4:	151.3276	2.26e4	0.40	0.14	104:	360.3248	1.10e5	1.73	0.35	138:	600.4658	2.81e4	0.44	0.09
5:	152.3299	5.08e3	0.15	0.05	105:	361.3276	2.74e4	0.43	0.09	140:	615.4874	2.08e4	0.33	0.07
6:	160.5548	5.65e3	0.10	0.04	106:	371.2288	3.16e4	0.50	0.10	142:	644.4950	3.00e4	0.47	0.09
7:	167.3900	3.16e5	5.67	1.97	107:	376.3171	1.79e4	0.28	0.06	144:	659.5137	2.17e4	0.34	0.07
8:	168.3929	1.18e5	2.12	0.74	108:	383.2050	4.31e4	0.68	0.14	146:	675.6761	2.54e4	0.40	0.08
9:	169.3962	2.35e4	0.42	0.15	109:	390.2079	1.10e5	1.73	0.35	147:	676.6794	2.54e4	0.40	0.08
10:	169.4523	5.57e5	100.00	34.68	110:	391.2112	1.10e5	1.73	0.35	148:	677.6827	2.54e4	0.40	0.08
11:	169.4553	2.08e6	37.35	12.95	111:	392.2145	1.10e5	1.73	0.35	149:	678.6860	2.54e4	0.40	0.08
12:	169.4560	3.68e5	6.57	2.28	112:	393.2178	1.10e5	1.73	0.35	150:	679.6893	2.54e4	0.40	0.08
13:	169.4622	5.27e4	0.95	0.33	113:	394.2211	1.10e5	1.73	0.35	151:	680.6926	2.54e4	0.40	0.08
14:	169.4625	6.35e3	0.11	0.04	114:	395.2244	1.10e5	1.73	0.35	152:	681.6959	2.54e4	0.40	0.08
15:	169.4791	7.61e3	0.14	0.05	115:	396.2277	1.10e5	1.73	0.35	153:	682.6992	2.54e4	0.40	0.08
16:	169.4339	8.68e5	15.58	5.40	116:	397.2310	1.10e5	1.73	0.35	154:	683.7025	2.54e4	0.40	0.08
17:	169.4373	3.40e5	6.11	2.12	117:	398.2343	1.10e5	1.73	0.35	155:	684.7058	2.54e4	0.40	0.08
18:	169.4402	7.25e4	1.30	0.45	118:	399.2376	1.10e5	1.73	0.35	156:	685.7091	2.54e4	0.40	0.08
19:	169.4436	1.12e4	0.20	0.07	119:	400.2409	1.10e5	1.73	0.35	157:	686.7124	2.54e4	0.40	0.08
20:	170.4075	2.65e5	4.75	1.65	120:	401.2442	1.10e5	1.73	0.35	158:	687.7157	2.54e4	0.40	0.08
21:	170.4113	1.12e5	2.01	0.70	121:	402.2475	1.10e5	1.73	0.35	159:	688.7190	2.54e4	0.40	0.08
22:	170.4115	4.11e4	0.74	0.26	122:	403.2508	1.10e5	1.73	0.35	160:	689.7223	2.54e4	0.40	0.08
23:	170.4133	1.12e4	0.20	0.07	123:	404.2541	1.10e5	1.73	0.35	161:	690.7256	2.54e4	0.40	0.08
24:	170.4894	4.28e4	0.77	0.27	124:	405.2574	1.10e5	1.73	0.35	162:	691.7289	2.54e4	0.40	0.08
25:	170.4973	3.16e4	0.57	0.20	125:	406.2607	1.10e5	1.73	0.35	163:	692.7322	2.54e4	0.40	0.08
26:	170.5040	1.08e4	0.19	0.07	126:	407.2640	1.10e5	1.73	0.35	164:	693.7355	2.54e4	0.40	0.08
27:	171.5054	5.82e4	1.04	0.36	127:	408.2673	1.10e5	1.73	0.35	165:	694.7388	2.54e4	0.40	0.08
28:	172.5144	5.07e4	0.91	0.32	128:	409.2706	1.10e5	1.73	0.35	166:	695.7421	2.54e4	0.40	0.08
29:	173.5210	1.80e4	0.32	0.11	129:	410.2739	1.10e5	1.73	0.35	167:	696.7454	2.54e4	0.40	0.08
30:	173.5401	1.37e5	2.46	0.85	130:	411.2772	1.10e5	1.73	0.35	168:	697.7487	2.54e4	0.40	0.08
31:	173.5438	6.72e4	1.21	0.42	131:	412.2805	1.10e5	1.73	0.35	169:	698.7520	2.54e4	0.40	0.08
32:	173.5449	1.83e4	0.33	0.11	132:	413.2838	1.10e5	1.73	0.35	170:	699.7553	2.54e4	0.40	0.08
33:	175.5562	2.47e6	44.29	15.36	133:	414.2871	1.10e5	1.73	0.35	171:	700.7586	2.54e4	0.40	0.08
34:	175.5594	1.09e6	19.39	6.72	134:	415.2904	1.10e5	1.73	0.35	172:	701.7619	2.54e4	0.40	0.08
35:	175.5628	2.30e5	4.13	1.43	135:	416.2937	1.10e5	1.73	0.35	173:	702.7652	2.54e4	0.40	0.08
36:	175.5657	3.83e4	0.69	0.24	136:	417.2970	1.10e5	1.73	0.35	174:	703.7685	2.54e4	0.40	0.08
37:	176.5716	5.06e5	9.07	3.15	137:	418.3003	1.10e5	1.73	0.35	175:	704.7718	2.54e4	0.40	0.08
38:	176.5751	2.43e5	4.36	1.51	138:	419.3036	1.10e5	1.73	0.35	176:	705.7751	2.54e4	0.40	0.08
39:	176.5784	6.11e4	1.10	0.38	139:	420.3069	1.10e5	1.73	0.35	177:	706.7784	2.54e4	0.40	0.08
40:	176.5811	1.11e4	0.20	0.07	140:	421.3102	1.10e5	1.73	0.35	178:	707.7817	2.54e4	0.40	0.08
41:	177.5858	6.69e3	0.12	0.04	141:	422.3135	1.10e5	1.73	0.35	179:	708.7850	2.54e4	0.40	0.08
42:	177.5884	2.60e4	0.47	0.16	142:	423.3168	1.10e5	1.73	0.35	180:	709.7883	2.54e4	0.40	0.08
43:	177.5915	1.49e4	0.27	0.09	143:	424.3201	1.10e5	1.73	0.35	181:	710.7916	2.54e4	0.40	0.08
44:	193.5853	2.41e4	0.43	0.15	144:	425.3234	1.10e5	1.73	0.35	182:	711.7949	2.54e4	0.40	0.08
45:	194.5882	1.52e4	0.27	0.09	145:	426.3267	1.10e5	1.73	0.35	183:	712.7982	2.54e4	0.40	0.08
46:	197.7096	3.81e4	0.68	0.24	146:	427.3300	1.10e5	1.73	0.35	184:	713.8015	2.54e4	0.40	0.08
47:	197.7140	2.80e4	0.50	0.17	147:	428.3333	1.10e5	1.73	0.35	185:	714.8048	2.54e4	0.40	0.08
48:	197.7158	9.91e3	0.19	0.06	148:	429.3366	1.10e5	1.73	0.35	186:	715.8081	2.54e4	0.40	0.08
49:	199.7411	8.08e3	0.15	0.05	149:	430.3399	1.10e5	1.73	0.35	187:	716.8114	2.54e4	0.40	0.08
50:	199.7424	6.02e3	0.11	0.04	150:	431.3432	1.10e5	1.73	0.35	188:	717.8147	2.54e4	0.40	0.08

CIH-13

PAT190213-63287-02 871 (9.663) AM (Cen,4, 80.00, Ar,10000.0,0.00,0.00); Cm (855:890-(901193348M3883))

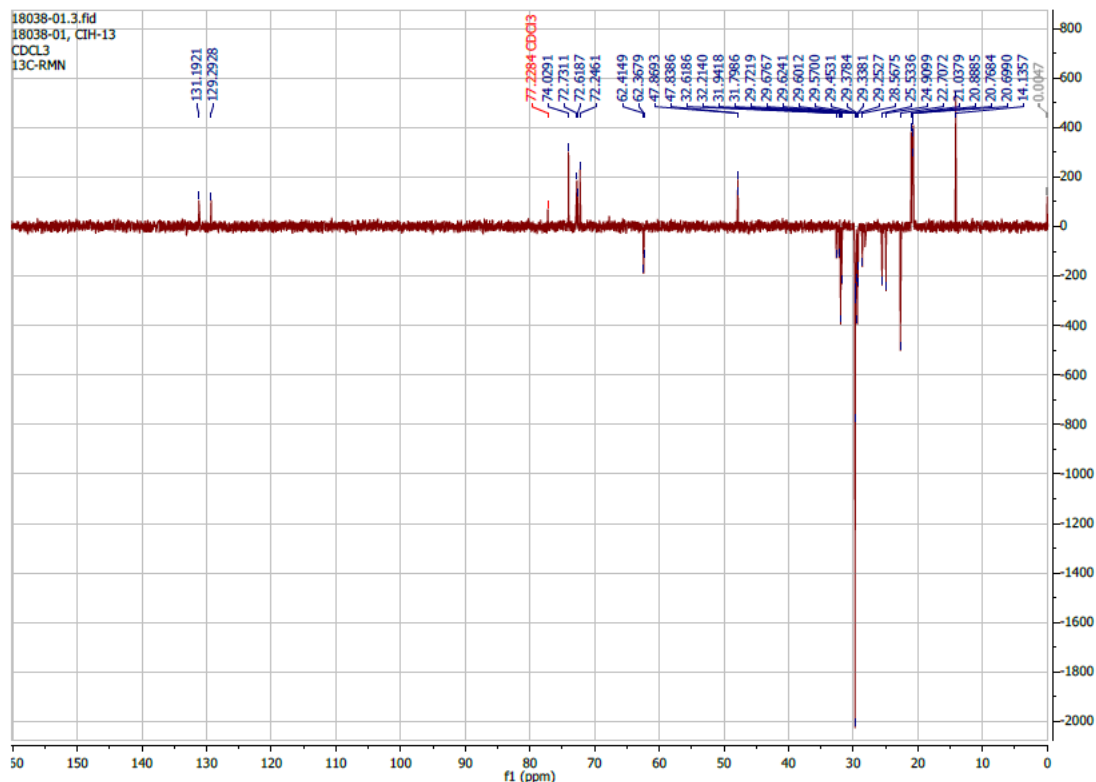
No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC
1:	648.6278	1.53e4	0.60	0.23										
2:	649.6329	6.49e3	0.25	0.10										
3:	666.6381	1.40e5	5.47	2.13										
4:	667.6422	6.28e4	2.46	0.95										
5:	668.6469	1.37e4	0.53	0.21										
6:	678.6401	2.31e4	0.90	0.35										
7:	679.6428	1.04e4	0.41	0.16										
8:	680.6482	3.15e3	0.12	0.05										
9:	684.6498	2.56e6	100.00	38.86										
10:	685.6534	9.79e5	38.24	14.86										
11:	686.6561	1.04e5	7.58	2.95										
12:	687.6589	3.21e4	1.25	0.49										
13:	688.6619	4.78e3	0.19	0.07										
14:	696.6492	3.26e5	12.72	4.94										
15:	697.6529	1.41e5	5.53	2.15										
16:	698.6582	5.62e4	2.20	0.85										
17:	699.6628	1.45e4	0.57	0.22										
18:	706.6307	7.98e5	31.17	12.11										
19:	707.6344	3.22e5	12.59	4.89										
20:	708.6370	6.91e4	2.70	1.05										
21:	709.6416	1.22e4	0.48	0.18										
22:	710.6569	6.68e3	0.26	0.10										
23:	718.6310	1.24e5	4.83	1.88										
24:	719.6348	5.60e4	2.19	0.85										
25:	722.6047	6.83e4	2.67	1.04										
26:	723.6073	2.97e4	1.16	0.45										
27:	724.6078	1.24e4	0.49	0.19										
28:	725.6125	2.98e3	0.12	0.05										
29:	734.6037	1.35e4	0.53	0.20										
30:	735.6058	6.19e3	0.24	0.09										
31:	768.6017	9.77e3	0.38	0.15										
32:	769.6054	4.66e3	0.18	0.07										
33:	774.6223	3.00e3	0.12	0.05										
34:	806.5485	2.86e3	0.11	0.04										
35:	826.5728	2.96e3	0.12	0.04										
36:	836.5853	3.15e3	0.12	0.05										
37:	858.5682	3.50e3	0.14	0.05										
38:	904.5763	3.02e3	0.12	0.05										
39:	1096.9066	8.34e3	0.33	0.13										
40:	1097.9119	7.52e3	0.29	0.11										

Espectro numérico de CIH-13-III

CIH-13

PAT190213-63287-02 1123 (12.450) AM (Cen,4, 80.00, Ar,10000.0,0.00,0.00); Cm (1119:1129-1098:1111) 1: TOF MS ES+

No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC
1:	88.1133	3.02e3	0.27	0.08	59:	716.5505	2.04e3	0.18	0.05	117:	913.3581	1.66e3	0.15	0.04
2:	89.0611	4.03e3	0.36	0.11	60:	716.6975	1.88e3	0.17	0.05	118:	913.6893	1.87e3	0.17	0.05
3:	93.0346	3.14e3	0.28	0.08	61:	720.6523	1.96e3	0.18	0.05	119:	914.0267	2.02e3	0.18	0.05
4:	121.0293	3.69e3	0.33	0.10	62:	721.5804	2.79e3	0.25	0.07	120:	922.7012	1.46e3	0.13	0.04
5:	133.0849	5.77e3	0.52	0.15	63:	722.5818	1.06e3	0.15	0.04	121:	933.0369	1.97e3	0.18	0.05
6:	149.0245	4.08e4	3.67	1.07	64:	724.6819	5.10e4	4.59	1.34	122:	933.7020	2.29e3	0.21	0.06
7:	150.0279	2.44e3	0.22	0.06	65:	725.6861	2.46e4	2.20	0.64	123:	936.7666	1.50e3	0.14	0.04
8:	177.1124	3.45e3	0.31	0.09	66:	726.6968	4.05e4	3.64	1.06	124:	943.6857	3.21e3	0.29	0.08
9:	327.2022	2.66e3	0.24	0.07	67:	727.6990	1.65e4	1.49	0.43	125:	944.6847	1.87e3	0.17	0.05
10:	350.3441	2.31e3	0.21	0.06	68:	728.7020	4.86e3	0.44	0.13	126:	952.3806	1.58e3	0.14	0.04
11:	371.2308	2.08e3	0.19	0.05	69:	734.6641	2.31e5	20.82	6.07	127:	952.7177	1.78e3	0.16	0.05
12:	408.2093	2.62e3	0.24	0.07	70:	735.6671	9.71e4	8.74	2.55	128:	954.7167	1.51e3	0.14	0.04
13:	526.4368	1.83e3	0.16	0.05	71:	736.6708	2.42e4	2.18	0.64	129:	955.2186	1.60e3	0.14	0.04
14:	540.4509	2.05e3	0.18	0.05	72:	737.6638	1.59e3	0.14	0.04	130:	955.7372	1.54e3	0.14	0.04
15:	556.4450	2.06e3	0.18	0.05	73:	737.6719	4.13e3	0.37	0.11	131:	956.7228	1.73e3	0.16	0.05
16:	565.5676	2.33e3	0.21	0.06	74:	738.6673	1.39e4	1.25	0.37	132:	960.7094	7.59e3	0.68	0.20
17:	570.4649	3.68e3	0.33	0.10	75:	739.7002	6.64e3	0.60	0.17	133:	961.7094	5.13e3	0.46	0.13
18:	584.4756	1.69e3	0.15	0.04	76:	740.7050	2.94e3	0.26	0.08	134:	962.7209	4.76e3	0.43	0.12
19:	593.5897	2.01e3	0.18	0.05	77:	746.5599	2.70e3	0.24	0.07	135:	963.7241	2.68e3	0.24	0.07
20:	600.4732	2.14e3	0.19	0.06	78:	746.6628	1.30e4	1.17	0.34	136:	965.6622	2.44e3	0.22	0.06
21:	607.3940	1.94e3	0.17	0.05	79:	747.6665	7.01e3	0.63	0.18	137:	966.6646	1.61e3	0.14	0.04
22:	614.4850	4.34e3	0.39	0.11	80:	748.6768	1.00e4	0.90	0.26	138:	967.6647	1.23e3	0.19	0.06
23:	626.5034	1.16e3	0.11	0.04	81:	749.6818	4.04e3	0.36	0.11	139:	971.7314	1.96e3	0.18	0.05
24:	640.5830	2.42e3	0.22	0.06	82:	750.5578	7.45e3	0.67	0.20	140:	972.6684	1.76e3	0.16	0.05
25:	641.4553	2.09e3	0.19	0.05	83:	750.6370	2.59e4	2.33	0.68	141:	980.2774	6.74e3	0.61	0.18
26:	641.5799	1.91e3	0.17	0.05	84:	751.5665	3.95e3	0.36	0.10	142:	981.2806	6.49e3	0.58	0.17
27:	644.4973	2.18e3	0.20	0.06	85:	751.6426	1.11e4	1.00	0.29	143:	981.6407	1.77e3	0.16	0.05
28:	658.5199	3.68e3	0.33	0.10	86:	752.6390	5.08e3	0.46	0.13	144:	982.2797	5.00e3	0.50	0.15
29:	663.4542	1.10e4	0.99	0.29	87:	753.6422	1.81e3	0.16	0.05	145:	983.2772	3.84e3	0.35	0.10
30:	664.4584	5.74e3	0.52	0.15	88:	754.6454	1.57e3	0.14	0.04	146:	983.7465	1.69e3	0.15	0.04
31:	668.6184	3.05e3	0.27	0.08	89:	760.6771	3.12e3	0.28	0.08	147:	984.2678	2.84e3	0.26	0.07
32:	669.6191	1.70e3	0.15	0.04	90:	761.6830	1.46e3	0.13	0.04	148:	984.7356	1.63e3	0.15	0.04
33:	672.5327	2.06e3	0.19	0.05	91:	762.6387	2.35e3	0.21	0.06	149:	985.2650	1.74e3	0.16	0.05
34:	676.6603	4.51e3	0.41	0.12	92:	764.5759	2.09e3	0.19	0.05	150:	1006.7540	1.46e3	0.13	0.04
35:	677.6646	2.15e3	0.19	0.06	93:	778.5861	1.92e3	0.17	0.05	151:	1010.7587	1.46e3	0.13	0.04
36:	684.6479	3.34e3	0.30	0.09	94:	786.7002	2.16e3	0.19	0.06	152:	1012.7573	1.84e3	0.17	0.05
37:	685.6478	1.79e3	0.16	0.05	95:	792.6181	2.52e3	0.23	0.07	153:	1013.2617	1.65e3	0.15	0.04
38:	687.6776	2.42e3	0.22	0.06	96:	796.6352	2.52e3	0.23	0.07	154:	1013.7566	2.43e3	0.22	0.06
39:	688.5240	1.98e3	0.18	0.05	97:	797.6149	2.44e3	0.22	0.06	155:	1041.7761	2.05e3	0.18	0.05
40:	688.6727	1.83e3	0.17	0.05	98:	802.6536	2.30e3	0.21	0.06	156:	1042.2613	1.74e3	0.16	0.05
41:	694.6705	4.44e4	4.00	1.16	99:	804.6180	1.54e3	0.14	0.04	157:	1042.7838	1.83e3	0.16	0.05
42:	695.6730	2.15e4	1.93	0.58	100:	816.6212	2.26e3	0.20	0.06	158:	1070.8024	1.68e3	0.15	0.04
43:	696.6702	6.95e3	0.63	0.18	101:	816.9493	1.63e3	0.15	0.04	159:	1071.3073	2.66e3	0.24	0.07
44:	697.6688	2.33e3	0.21	0.06	102:	819.6346	2.22e3	0.20	0.06	160:	1071.8064	1.84e3	0.17	0.05
45:	698.6664	2.19e3	0.20	0.06	103:	834.6074	2.63e3	0.24	0.07	161:	1099.8287	2.37e3	0.21	0.06
46:	699.5944	7.80e3	0.70	0.20	104:	835.6165	1.59e3	0.14	0.04	162:	1100.3262	2.08e3	0.19	0.05
47:	700.5988	4.03e3	0.36	0.11	105:	836.2686	1.78e3	0.16	0.05	163:	1100.8204	2.27e3	0.20	0.06
48:	701.5935	1.47e3	0.13	0.04	106:	836.6352	2.60e3	0.23	0.07	164:	1124.0447	2.78e3	0.25	0.07
49:	702.5402	2.21e3	0.20	0.06	107:	848.6147	1.56e3	0.14	0.04	165:	1125.9430	2.17e3	0.20	0.06
50:	703.5407	1.81e3	0.16	0.05	108:	855.3044	1.64e3	0.15	0.04	166:	1128.8411	1.58e3	0.14	0.04
51:	706.6670	3.92e3	0.35	0.10	109:	855.6429	3.56e3	0.32	0.09	167:	1129.3560	2.57e3	0.23	0.07
52:	707.6639	1.92e3	0.17	0.05	110:	855.9794	1.57e3	0.14	0.04	168:	1129.8450	2.46e3	0.22	0.06
53:	708.6653	2.40e3	0.22	0.06	111:	856.2962	1.50e3	0.14	0.04	169:	1157.8666	2.06e3	0.19	0.05
54:	709.6813	1.53e3	0.14	0.04	112:	874.9950	1.96e3	0.18	0.05	170:	1158.3644	2.23e3	0.20	0.06
55:	711.6813	111000	29.13	8.34	113:	877.3399	1.71e3	0.16	0.05	171:	1158.8942	2.26e3	0.20	0.06
56:	713.6852	4.49e3	0.41	0.12	114:	894.0089	1.55e3	0.14	0.04	172:	1159.3638	1.46e3	0.13	0.04
57:	714.6889	9.18e4	8.24	2.40	115:	894.3441	1.90e3	0.17	0.05	173:	1186.8555	1.66e3	0.15	0.04
58:	715.6917	1.49e4	1.34	0.39	116:	894.6736	2.12e3	0.19	0.06	174:	1187.3949	1.90e3	0.17	0.05



DEP 135 de CIH-13Ac

PAT190213-62864-04 28 (0.321) AM (Cen,4, 80.00, Ar,10000.0,0.00,0.00); Cm (25:34-11:21)										1: TOF MS ES+				
No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC
1:	55.0549	1.52e4	0.30	0.06	59:	251.2374	1.61e4	0.32	0.06	117:	664.6242	4.60e4	0.92	0.17
2:	57.0713	1.81e4	0.36	0.07	60:	254.2489	4.70e4	0.94	0.17	118:	665.6270	2.15e4	0.43	0.08
3:	67.0549	1.87e4	0.38	0.07	61:	265.2540	1.63e4	0.33	0.06	119:	666.6097	2.37e4	0.48	0.09
4:	69.0704	4.07e4	0.82	0.15	62:	268.2641	4.86e4	0.97	0.18	120:	668.6202	6.60e5	13.24	2.41
5:	70.0663	1.56e4	0.31	0.06	63:	274.2747	3.41e4	0.68	0.12	121:	669.6230	2.55e5	5.11	0.93
6:	71.0663	1.93e4	0.39	0.07	64:	275.2754	1.84e4	0.37	0.07	122:	670.6280	6.81e4	1.37	0.25
7:	79.0550	1.50e4	0.30	0.05	65:	282.2798	4.49e4	0.90	0.16	123:	675.6775	4.82e4	0.97	0.18
8:	81.0703	6.13e4	1.23	0.22	66:	288.2907	2.11e4	0.42	0.08	124:	676.6802	2.57e4	0.52	0.09
9:	83.0860	6.07e4	1.22	0.22	67:	293.2849	1.64e4	0.33	0.06	125:	678.6323	1.57e4	0.32	0.06
10:	91.0551	1.74e4	0.35	0.06	68:	296.2954	2.57e4	0.52	0.09	126:	680.6191	4.85e4	0.97	0.18
11:	93.0700	2.73e4	0.55	0.10	69:	303.3052	4.42e5	8.86	1.61	127:	681.6233	2.22e4	0.44	0.08
12:	95.0857	7.54e4	1.51	0.28	70:	304.3084	9.22e4	1.85	0.34	128:	682.6353	2.36e6	47.38	8.62
13:	97.0649	1.99e4	0.40	0.07	71:	310.3109	6.08e4	1.22	0.22	129:	683.6388	9.06e5	18.17	3.31
14:	97.1015	7.06e4	1.42	0.26	72:	312.3264	5.22e4	1.05	0.19	130:	684.6430	1.97e5	3.34	0.72
15:	100.0751	2.19e4	0.44	0.08	73:	317.2845	2.08e4	0.42	0.08	131:	685.6466	3.61e4	0.72	0.13
16:	107.0859	4.06e4	0.82	0.15	74:	319.3003	2.19e4	0.84	0.15	132:	694.6346	1.68e4	0.34	0.06
17:	109.1019	6.05e4	1.21	0.22	75:	321.3163	9.20e5	18.45	3.35	133:	696.6511	4.65e5	9.33	1.70
18:	111.0806	2.37e4	0.48	0.09	76:	322.3194	1.70e5	3.41	0.62	134:	697.6542	1.86e5	3.74	0.68
19:	111.1168	4.87e4	0.98	0.18	77:	323.3225	1.90e4	0.38	0.07	135:	698.6573	5.08e4	1.02	0.19
20:	114.0552	2.61e4	0.52	0.10	78:	327.0791	3.51e4	0.70	0.13	136:	710.6670	1.54e5	3.09	0.56
21:	114.0915	3.70e4	0.74	0.13	79:	333.2800	1.96e4	0.39	0.07	137:	711.6702	6.84e4	1.37	0.25
22:	119.0857	4.63e4	0.93	0.17	80:	335.2951	6.80e4	1.36	0.25	138:	712.6726	2.00e4	0.40	0.07
23:	121.1015	5.51e4	1.11	0.20	81:	336.3167	3.93e4	0.79	0.14	139:	724.6818	1.83e4	0.37	0.07
24:	123.1172	4.36e4	0.87	0.16	82:	336.3167	3.93e4	0.79	0.14	140:	760.5950	1.69e4	0.34	0.06
25:	125.0964	1.90e4	0.38	0.07	83:	337.3173	1.58e4	0.32	0.06	141:	816.6572	1.01e5	2.02	0.37
26:	125.1329	2.71e4	0.54	0.10	84:	338.3425	4.99e6	100.00	18.19	142:	817.6606	5.01e4	1.00	0.18
27:	128.1077	3.38e4	0.68	0.12	85:	339.3461	9.19e5	18.44	3.35	143:	818.6652	1.72e4	0.35	0.06
28:	132.0659	1.85e4	0.37	0.07	86:	340.3525	1.49e5	2.99	0.54	144:	830.6735	1.33e5	2.67	0.49
29:	133.0905	2.80e4	0.56	0.10	87:	341.3580	2.20e4	0.44	0.08	145:	831.6771	6.47e4	1.30	0.24
30:	135.0805	1.55e4	0.31	0.06	88:	360.3245	1.72e4	0.35	0.06	146:	832.6785	2.21e4	0.44	0.08
31:	135.1168	7.51e4	1.51	0.27	89:	366.3742	1.90e4	0.38	0.07	147:	838.6403	2.41e4	0.48	0.09
32:	137.1323	2.65e4	0.53	0.10	90:	374.3033	1.34e5	2.70	0.49	148:	842.6723	2.02e4	0.40	0.07
33:	139.1123	2.00e4	0.40	0.07	91:	375.3069	3.23e4	0.65	0.12	149:	844.6887	5.30e5	10.64	1.93
34:	142.1229	3.01e4	0.60	0.11	92:	376.3187	8.55e4	1.71	0.31	150:	845.6922	2.46e5	4.93	0.90
35:	149.0242	7.80e4	1.56	0.28	93:	377.3217	1.95e4	0.39	0.07	151:	846.6962	7.25e4	1.45	0.26
36:	149.1332	6.42e4	1.29	0.23	94:	380.3319	3.80e4	0.76	0.14	152:	847.7004	1.69e4	0.34	0.06
37:	151.1483	1.67e4	0.34	0.06	95:	390.2990	3.07e4	0.62	0.11	153:	852.6551	2.72e4	0.55	0.10
38:	153.1279	1.86e4	0.38	0.07	96:	392.3140	2.62e4	0.53	0.10	154:	858.7042	1.34e5	2.68	0.49
39:	156.1388	3.23e4	0.65	0.12	97:	394.3293	2.18e4	0.44	0.08	155:	859.7073	6.76e4	1.36	0.25
40:	163.1484	4.57e4	0.92	0.17	98:	437.1946	1.27e5	2.55	0.46	156:	860.7089	2.39e4	0.48	0.09
41:	167.1435	1.68e4	0.34	0.06	99:	438.1981	2.99e4	0.60	0.11	157:	866.6703	7.78e4	1.56	0.28
42:	170.1542	2.96e4	0.59	0.11	100:	441.2981	4.74e4	0.95	0.17	158:	867.6740	4.26e4	0.86	0.16
43:	177.1644	3.45e4	0.69	0.13	101:	540.4614	1.66e4	0.33	0.06	159:	868.6781	1.76e4	0.35	0.06
44:	184.1698	3.21e4	0.64	0.12	102:	570.5108	3.59e4	0.72	0.13	160:	872.7200	5.52e4	1.11	0.20
45:	191.1796	2.57e4	0.51	0.09	103:	588.5417	1.11e5	2.22	0.40	161:	873.7230	3.05e4	0.61	0.11
46:	195.1751	1.56e4	0.31	0.06	104:	599.5449	4.32e4	0.87	0.16	162:	880.6842	2.37e4	0.48	0.09
47:	198.1859	3.27e4	0.66	0.12	105:	600.5530	1.83e4	0.37	0.07	163:	1194.8218	2.19e4	0.44	0.08
48:	205.1957	2.28e4	0.46	0.08	106:	626.5726	6.33e4	1.27	0.23	164:	1195.8234	1.81e4	0.36	0.07
49:	209.1906	1.64e4	0.33	0.06	107:	627.5768	2.56e4	0.51	0.09					
50:	212.2008	3.91e4	0.78	0.14	108:	636.5923	2.06e4	0.41	0.08					
51:	219.2113	2.23e4	0.45	0.08	109:	640.5884	4.63e4	0.93	0.17					
52:	223.2064	1.53e4	0.31	0.06	110:	641.5924	1.92e4	0.39	0.07					
53:	226.2170	4.38e4	0.88	0.16	111:	650.6084	1.90e4	0.38	0.07					
54:	230.2487	1.69e4	0.34	0.06	112:	654.6047	5.59e5	11.21	2.04					
55:	233.2270	2.05e4	0.41	0.07	113:	655.6081	2.12e5	4.25	0.77					
56:	237.2218	1.58e4	0.32	0.06	114:	656.6131	5.99e4	1.20	0.22					
57:	240.2329	4.91e4	0.99	0.18	115:	663.4560	5.55e4	1.11	0.20					
58:	247.2428	1.92e4	0.38	0.07	116:	664.4584	2.45e4	0.49	0.09					

Espectro numérico de CIH-10-I

CIH-10														
PAT100213-62664-04 66 (0.780) AM (Cen.4, 80.00, Ar.10000.0,0.00,0.00): Cm (45-98-181:199)														
No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC
1:	55.0556	3.08e4	0.39	0.11	59:	184.1700	5.87e4	0.74	0.21	117:	341.3539	2.09e4	0.26	0.07
2:	57.0713	3.19e4	0.40	0.11	60:	191.1802	5.04e4	0.64	0.18	118:	360.3246	1.36e5	1.72	0.48
3:	65.0399	1.50e4	0.19	0.05	61:	193.1961	1.59e4	0.20	0.06	119:	361.3277	3.56e4	0.45	0.13
4:	67.0552	2.87e4	0.36	0.10	62:	195.1750	3.26e4	0.41	0.11	120:	374.3030	2.10e5	2.64	0.74
5:	69.0708	6.86e4	0.87	0.24	63:	198.1861	6.40e4	0.81	0.22	121:	375.3068	5.37e4	0.68	0.19
6:	71.0866	3.43e4	0.43	0.12	64:	205.1958	4.33e4	0.55	0.15	122:	376.3184	1.77e5	2.24	0.62
7:	74.0974	5.32e4	0.67	0.19	65:	207.2116	1.91e4	0.24	0.07	123:	377.3216	4.22e4	0.53	0.15
8:	79.0551	2.09e4	0.26	0.07	66:	209.1907	2.82e4	0.36	0.10	124:	378.3303	1.48e4	0.19	0.05
9:	81.0706	9.51e4	1.20	0.33	67:	212.1187	2.01e4	0.25	0.07	125:	390.2939	1.54e4	0.19	0.05
10:	83.0503	1.52e4	0.19	0.05	68:	212.2012	7.20e4	0.91	0.25	126:	392.2637	2.95e4	0.37	0.10
11:	83.0863	1.11e5	1.41	0.39	69:	219.2114	4.10e4	0.52	0.14	127:	393.2963	1.47e5	1.86	0.52
12:	85.1020	2.81e4	0.35	0.10	70:	221.2265	2.06e4	0.26	0.07	128:	394.3027	4.34e4	0.55	0.15
13:	86.0609	1.44e4	0.18	0.05	71:	223.2061	3.09e4	0.39	0.11	129:	406.2028	8.03e4	1.01	0.28
14:	89.0608	1.94e4	0.24	0.07	72:	226.2175	8.19e4	1.03	0.29	130:	407.2054	2.66e4	0.34	0.09
15:	93.0342	3.07e4	0.39	0.11	73:	227.2204	1.59e4	0.20	0.06	131:	413.2657	1.01e5	1.27	0.35
16:	93.0705	4.49e4	0.57	0.16	74:	233.2268	3.88e4	0.49	0.14	132:	414.2700	2.57e4	0.32	0.09
17:	95.0862	1.15e5	1.46	0.41	75:	237.2218	3.05e4	0.38	0.11	133:	415.2596	1.59e4	0.20	0.06
18:	97.0653	3.52e4	0.44	0.12	76:	240.2330	8.51e4	1.07	0.30	134:	422.2947	2.93e4	0.37	0.10
19:	97.1019	1.27e5	1.60	0.45	77:	241.2365	1.51e4	0.19	0.05	135:	441.2980	9.16e5	11.56	3.22
20:	100.0764	3.80e4	0.48	0.13	78:	247.2429	3.81e4	0.48	0.13	136:	442.3014	2.26e5	2.85	0.80
21:	102.1282	2.74e4	0.35	0.10	79:	251.0472	4.25e4	0.54	0.15	137:	443.3050	4.03e4	0.51	0.14
22:	103.0566	2.69e4	0.34	0.09	80:	251.2379	3.00e4	0.38	0.11	138:	447.3444	1.71e4	0.22	0.06
23:	107.0853	5.64e4	0.71	0.20	81:	254.2491	8.67e4	1.09	0.30	139:	455.3109	1.99e4	0.25	0.07
24:	109.1020	9.57e4	1.21	0.34	82:	255.2522	1.66e4	0.21	0.06	140:	483.3200	2.66e4	0.34	0.09
25:	111.0451	1.62e4	0.20	0.06	83:	261.2581	2.06e4	0.26	0.07	141:	598.5408	1.48e4	0.19	0.05
26:	111.0813	4.30e4	0.54	0.15	84:	265.2535	3.19e4	0.40	0.11	142:	614.4833	1.75e4	0.22	0.06
27:	111.1173	9.18e4	1.16	0.32	85:	266.2643	8.80e4	1.11	0.31	143:	654.6033	5.68e4	0.72	0.20
28:	114.0918	6.30e4	0.80	0.22	86:	269.2678	1.71e4	0.22	0.06	144:	655.6065	2.45e4	0.31	0.09
29:	116.1438	1.55e5	1.96	0.54	87:	275.2739	2.73e4	0.34	0.10	145:	658.5105	1.62e4	0.20	0.06
30:	117.1467	1.47e4	0.19	0.05	88:	279.0942	3.55e4	0.45	0.12	146:	663.4533	2.77e4	0.35	0.10
31:	121.0290	6.12e4	0.77	0.21	89:	279.2693	2.16e4	0.27	0.08	147:	668.6185	6.15e4	0.78	0.22
32:	121.1019	9.15e4	1.15	0.32	90:	282.2794	8.48e4	1.07	0.30	148:	669.6226	2.81e4	0.35	0.10
33:	123.1175	7.29e4	0.92	0.26	91:	283.2822	1.98e4	0.25	0.07	149:	675.6760	8.89e4	1.12	0.31
34:	125.0972	4.58e4	0.58	0.16	92:	284.2383	3.00e4	0.38	0.11	150:	676.6792	4.39e4	0.55	0.15
35:	125.1333	5.05e4	0.64	0.18	93:	284.2953	3.32e4	0.42	0.12	151:	682.6339	1.56e5	1.97	0.55
36:	128.1079	6.18e4	0.78	0.22	94:	293.2849	4.13e4	0.52	0.15	152:	683.6382	7.41e4	0.93	0.25
37:	129.0655	2.54e4	0.32	0.09	95:	296.2954	4.77e4	0.60	0.17	153:	684.6420	2.10e4	0.27	0.07
38:	130.1599	1.79e4	0.23	0.06	96:	301.2892	1.54e4	0.19	0.05	154:	696.6498	4.07e4	0.51	0.14
39:	133.0881	3.26e4	0.41	0.11	97:	303.3052	7.47e5	9.43	2.63	155:	697.6545	1.66e4	0.23	0.07
40:	135.1172	1.31e5	1.65	0.46	98:	304.3086	1.65e5	2.09	0.58	156:	702.5362	1.53e4	0.19	0.05
41:	136.1204	1.46e4	0.18	0.05	99:	305.3120	1.94e4	0.25	0.07	157:	710.6638	1.51e4	0.19	0.05
42:	137.1330	4.70e4	0.59	0.17	100:	310.3109	1.25e5	1.52	0.42	158:	800.6710	1.69e4	0.20	0.06
43:	139.1126	4.12e4	0.52	0.14	101:	311.3142	2.93e4	0.37	0.10	159:	844.6566	4.42e4	0.56	0.16
44:	139.1488	2.06e4	0.26	0.07	102:	312.3264	1.25e5	1.52	0.42	160:	845.6913	2.33e4	0.29	0.08
45:	142.1232	5.60e4	0.71	0.20	103:	313.3299	2.57e4	0.32	0.09	161:	858.6890	1.99e4	0.25	0.07
46:	149.0241	4.52e5	5.70	1.59	104:	317.2844	2.40e4	0.30	0.08	162:	866.6708	2.25e4	0.28	0.08
47:	149.1333	1.17e5	1.47	0.41	105:	319.3003	4.89e4	0.62	0.17					
48:	150.0274	3.56e4	0.45	0.13	106:	320.3171	2.31e4	0.29	0.08					
49:	151.1486	2.96e4	0.37	0.10	107:	321.3161	1.50e6	18.90	5.26					
50:	153.1284	3.46e4	0.44	0.12	108:	322.3195	3.14e5	3.96	1.10					
51:	156.1388	5.16e4	0.65	0.18	109:	323.3227	3.66e4	0.46	0.13					
52:	163.1486	8.14e4	1.03	0.29	110:	326.3792	4.32e4	0.54	0.15					
53:	165.1643	1.98e4	0.25	0.07	111:	335.2953	4.41e4	0.56	0.16					
54:	167.1438	3.04e4	0.38	0.11	112:	336.2151	3.75e4	0.47	0.13					
55:	170.1547	5.53e4	0.70	0.19	113:	336.3228	4.02e4	0.51	0.14					
56:	177.1646	6.15e4	0.78	0.22	114:	338.3423	7.93e6	100.00	27.85					
57:	179.1797	1.52e4	0.19	0.05	115:	339.3456	1.47e6	18.50	5.15					
58:	181.1593	2.80e4	0.35	0.10	116:	340.3500	1.95e5	2.45	0.68					

Espectro numérico de CIH-10-II

CIH-10

PAT180213-62664-04 144 (1.606) AM (Cen.4, 80.00, Ar.10000.0,0.00,0.00): Cm (137-149-180-202)DF MS ES+

No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC	No	Mass	Inten	%BPI	%TIC
1:	55.0555	1.53e4	0.18	0.05	60:	219.2117	2.81e4	0.34	0.10					
2:	57.0716	2.08e4	0.25	0.12	61:	221.2271	1.50e4	0.18	0.09					
3:	67.0555	1.66e4	0.20	0.10	62:	222.2304	2.09e4	0.24	0.11					
4:	69.0712	4.48e4	0.54	0.26	63:	226.2178	5.02e4	0.71	0.34					
5:	71.0868	2.44e4	0.29	0.14	64:	227.2208	9.16e3	0.11	0.05					
6:	79.0556	9.83e3	0.12	0.06	65:	233.2274	2.83e4	0.34	0.16					
7:	81.0708	5.90e4	0.72	0.34	66:	237.2222	2.08e4	0.26	0.10					
8:	83.0860	7.94e4	0.95	0.46	67:	240.2333	6.34e4	0.76	0.36					
9:	85.1021	1.84e4	0.22	0.11	68:	241.2362	9.80e3	0.12	0.06					
10:	86.0613	9.21e3	0.11	0.05	69:	247.2434	2.94e4	0.36	0.17					
11:	93.0349	1.34e4	0.16	0.08	70:	251.2382	2.15e4	0.26	0.12					
12:	93.0709	2.60e4	0.31	0.15	71:	254.2492	6.26e4	0.76	0.36					
13:	95.0865	7.46e4	0.90	0.43	72:	255.2526	1.24e4	0.15	0.07					
14:	97.0655	2.14e4	0.26	0.12	73:	261.2589	1.41e4	0.17	0.08					
15:	97.1021	9.18e4	1.11	0.53	74:	265.2540	3.33e4	0.28	0.13					
16:	100.0766	2.73e4	0.33	0.16	75:	268.2646	6.95e4	0.84	0.40					
17:	107.0865	3.34e4	0.40	0.19	76:	269.2680	1.14e4	0.14	0.07					
18:	109.1022	6.30e4	0.77	0.37	77:	279.2689	1.29e4	0.16	0.07					
19:	111.0809	2.69e4	0.32	0.15	78:	282.2802	6.47e4	0.78	0.37					
20:	111.1174	6.71e4	0.81	0.39	79:	283.2838	1.26e4	0.15	0.07					
21:	114.0920	4.44e4	0.54	0.26	80:	286.2955	3.51e4	0.42	0.20					
22:	121.0292	2.53e4	0.30	0.15	81:	297.2994	9.16e3	0.11	0.05					
23:	121.1020	5.75e4	0.69	0.33	82:	303.3055	6.88e5	8.30	3.96					
24:	123.1178	4.86e4	0.59	0.28	83:	304.3088	1.33e5	1.61	0.77					
25:	125.0862	4.82e4	0.58	0.28	84:	305.3120	1.44e4	0.17	0.08					
26:	125.1172	8.83e4	1.07	0.51	85:	312.3269	7.90e4	0.95	0.45					
27:	127.1021	3.44e4	0.41	0.20	86:	313.3301	1.54e4	0.19	0.09					
28:	128.1082	4.82e4	0.58	0.28	87:	321.3166	1.45e4	0.17	0.08					
29:	135.1172	8.83e4	1.07	0.51	88:	322.3199	2.70e5	3.26	1.55					
30:	137.1333	3.00e4	0.37	0.18	89:	323.3233	2.84e4	0.34	0.16					
31:	139.1127	2.50e4	0.31	0.15	90:	338.2936	8.89e3	0.11	0.05					
32:	139.1489	1.14e4	0.18	0.09	91:	338.3425	2.29e4	0.27	0.10					
33:	140.1235	2.05e4	0.23	0.10	92:	338.4484	2.15e4	0.26	0.12					
34:	140.2427	2.25e5	2.71	1.29	93:	339.3463	1.54e4	0.18	0.08					
35:	149.1335	7.83e4	0.94	0.45	94:	340.3469	9.22e4	1.09	0.52					
36:	150.0293	5.75e4	0.69	0.33	95:	360.3247	9.02e4	1.09	0.52					
37:	150.1371	8.90e3	0.11	0.05	96:	361.3292	2.18e4	0.26	0.12					
38:	151.1488	1.94e4	0.23	0.11	97:	362.2616	1.42e4	0.17	0.08					
39:	153.1281	2.34e4	0.28	0.13	98:	422.2046	1.04e4	0.13	0.06					
40:	154.1644	8.93e3	0.10	0.05	99:	438.2674	8.93e3	0.11	0.05					
41:	155.1390	3.66e4	0.48	0.23	100:	441.2682	5.89e5	7.11	3.39					
42:	163.1489	5.85e4	0.71	0.34	101:	442.3014	1.31e5	1.57	0.73					
43:	163.1613	2.27e4	0.27	0.13	102:	443.3040	1.98e4	0.24	0.11					
44:	167.1441	2.03e4	0.24	0.12	103:	654.6031	8.81e3	0.11	0.05					
45:	170.1548	4.02e4	0.48	0.23	104:	675.6762	8.80e4	1.09	0.51					
46:	177.1645	4.20e4	0.51	0.24	105:	676.6795	4.21e4	0.49	0.23					
47:	179.1796	3.35e3	0.11	0.05	106:	677.6827	1.06e4	0.13	0.06					
48:	181.1593	1.83e4	0.22	0.10	107:	682.6339	2.13e4	0.26	0.12					
49:	184.1700	4.34e4	0.52	0.25	108:	683.6394	1.05e4	0.13	0.06					
50:	185.1738	8.49e3	0.10	0.05	109:	759.6281	8.29e3	0.10	0.05					
51:	191.1809	3.37e4	0.41	0.19	110:	934.6420	1.09e4	0.13	0.06					
52:	193.1959	1.05e4	0.13	0.06										
53:	195.1755	1.95e4	0.24	0.11										
54:	198.1899	4.89e4	0.59	0.28										
55:	205.1959	3.04e4	0.37	0.17										
56:	207.2115	1.53e4	0.18	0.09										
57:	199.1913	1.82e4	0.22	0.10										
58:	212.2014	5.40e4	0.65	0.31										

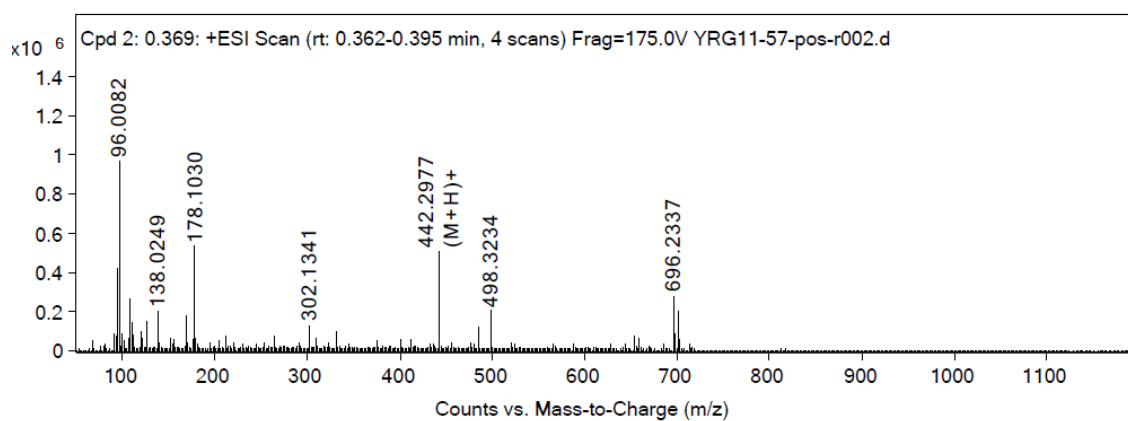
CIH-10
PAT190213-62664-04 379 (4.210) AM (C)

No	Mass	Inten	%BPI	%TIC
1:	88.1121	5.96e4	2.74	0.85
2:	89.1153	3.45e3	0.16	0.05
3:	102.1230	4.91e3	0.23	0.07
4:	551.3277	1.01e4	0.47	0.14
5:	552.3337	3.48e3	0.16	0.05
6:	607.3906	1.34e5	6.16	1.90
7:	608.3937	5.15e4	2.37	0.73
8:	609.3979	9.65e3	0.44	0.14
9:	626.5713	1.61e4	0.74	0.23
10:	627.5755	5.85e3	0.27	0.08
11:	663.4523	2.18e6	100.00	30.94
12:	664.4561	8.17e5	37.52	11.61
13:	665.4596	1.52e5	7.00	2.17
14:	666.4633	2.24e4	1.03	0.32
15:	667.4658	2.66e3	0.12	0.04
16:	680.4791	2.49e3	0.11	0.04
17:	685.4352	3.25e5	14.95	4.62
18:	686.4382	1.34e5	6.17	1.91
19:	687.4411	2.97e4	1.37	0.42
20:	688.4460	4.09e3	0.19	0.06
21:	701.4089	1.09e5	5.01	1.56
22:	702.4122	4.87e4	2.24	0.69
23:	703.4131	1.95e4	0.90	0.28
24:	704.4122	5.00e3	0.23	0.07
25:	707.4901	2.43e4	1.12	0.35
26:	708.4998	1.88e4	0.87	0.27
27:	709.5032	5.93e3	0.27	0.08
28:	721.5060	3.61e4	1.66	0.51
29:	722.5151	3.02e4	1.39	0.43
30:	723.5225	9.81e3	0.45	0.14
31:	724.5197	2.34e3	0.11	0.03
32:	736.5422	7.45e4	3.42	1.06
33:	737.5457	3.67e4	1.69	0.52
34:	738.5460	1.12e4	0.51	0.16
35:	750.5579	1.22e6	56.07	17.35
36:	751.5610	5.39e5	24.75	7.66
37:	752.5640	1.17e5	5.36	1.66
38:	753.5671	1.98e4	0.91	0.28
39:	754.5683	2.64e3	0.12	0.04
40:	764.5728	2.62e5	12.04	3.72
41:	765.5759	1.30e5	5.96	1.84
42:	766.4013	2.42e3	0.11	0.03
43:	766.5799	3.46e4	1.59	0.49
44:	767.5832	5.74e3	0.26	0.08
45:	778.5892	1.24e4	0.57	0.18
46:	779.5912	7.88e3	0.36	0.11
47:	788.6214	2.36e3	0.11	0.03
48:	810.6047	5.09e3	0.23	0.07
49:	863.5839	8.46e3	0.39	0.12
50:	964.5901	4.39e3	0.20	0.06
51:	1075.7122	1.78e4	0.82	0.25
52:	1076.7163	1.23e4	0.56	0.17
53:	1077.7203	3.86e3	0.18	0.05
54:	1103.7485	3.40e3	0.16	0.05
55:	1104.7477	2.54e3	0.12	0.04

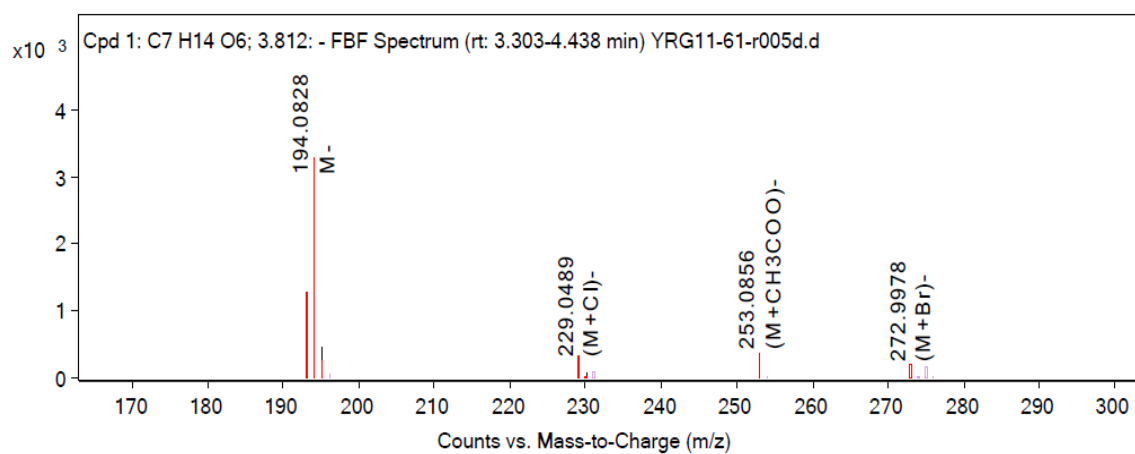
CIH-10
PAT190213-62664-04 647 (7.178) AM (C)

No	Mass	Inten	%BPI	%TIC
1:	664.6246	3.72e4	1.83	0.60
2:	665.6294	1.77e4	0.87	0.29
3:	682.6380	2.03e6	100.00	32.99
4:	683.6396	7.52e5	37.03	12.21
5:	684.6418	1.43e5	7.04	2.32
6:	685.6458	2.07e4	1.02	0.34
7:	826.6772	6.92e3	0.34	0.11
8:	827.6837	3.84e3	0.19	0.06
9:	844.6895	4.24e5	20.89	6.89
10:	845.6932	2.04e5	10.04	3.31
11:	846.6961	5.19e4	2.55	0.84
12:	847.6990	9.99e3	0.49	0.16
13:	864.6642	3.19e3	0.16	0.05
14:	866.6710	1.35e6	66.27	21.86
15:	866.6739	2.47e3	0.12	0.04
16:	867.6743	6.11e5	30.06	9.92
17:	868.6777	1.39e5	6.86	2.26
18:	869.6813	2.45e4	1.21	0.40
19:	870.6808	3.55e3	0.17	0.06
20:	882.6450	9.51e4	4.68	1.54
21:	883.6487	4.83e4	2.38	0.78
22:	884.6484	1.91e4	0.94	0.31
23:	885.6508	4.95e3	0.24	0.08
24:	888.7277	4.38e3	0.22	0.07
25:	889.7333	2.45e3	0.12	0.04
26:	898.6111	6.49e3	0.32	0.11
27:	899.6104	2.90e3	0.14	0.05
28:	902.7413	1.63e4	0.80	0.26
29:	903.7457	9.95e3	0.49	0.16
30:	904.7516	2.47e3	0.12	0.04
31:	920.5945	2.45e3	0.12	0.04
32:	928.6425	6.35e3	0.31	0.10
33:	929.6470	3.85e3	0.19	0.06
34:	931.7939	4.64e3	0.23	0.08
35:	932.7978	2.37e3	0.12	0.04
36:	945.8117	3.26e3	0.16	0.05
37:	950.6273	2.98e3	0.15	0.05

Espectros numéricos de CIH-10-IV y V



Espectro EM-ESI de la LCB acetilada de **CIH-10**



Espectro HRMS-ESI (modo negativo) de la glucosa metilada obtenida por la metanólisis de **CIH-10**

Modeling Antibacterial Activity with Machine Learning and Fusion of Chemical Structure Information with Microorganism Metabolic Networks

Deyani Nocado-Mena,^{†,‡,§} Carlos Cornelio,[†] María del Rayo Camacho-Corona,^{*,‡}
Elvira Garza-González,[§] Noemi Walsman de Torres,^{||} Sonia Arrasate,^{†,§} Nuria Sotomayor,^{†,§}
Esther Lete,^{†,§} and Humbert González-Díaz^{*,†,‡,§}

[†]Department of Organic Chemistry II, University of the Basque Country UPV/EHU, 48940 Leioa, Spain

[‡]Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, CP 66455 San Nicolás de los Gama, Nuevo León, México

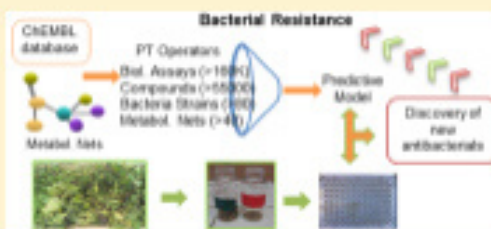
[§]Servicio de Gastroenterología, Hospital Universitario, Dr. Eleuterio González, Universidad Autónoma de Nuevo León, CP 64460 Monterrey, Nuevo León, México

^{||}Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, CP 64460 Monterrey, Nuevo León, México

^{*}IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, 48011 Bilbao, Biscay, Spain

 Supporting Information

ABSTRACT: Predicting the activity of new chemical compounds over pathogenic microorganisms with different metabolic reaction networks (MRN_i) is an important goal due to the different susceptibility to antibiotics. The ChEMBL database contains >160 000 outcomes of preclinical assays of antimicrobial activity for 55 931 compounds with >365 parameters of activity (MIC, IC₅₀, etc.) and >90 bacteria strains of >25 bacterial species. In addition, the Leong and Barabási data set includes >40 MRNs of microorganisms. However, there are no models able to predict antibacterial activity for multiple assays considering both drug and MRN structures at the same time. In this work, we combined perturbation theory, machine learning, and information fusion techniques to develop the first PTMLIF model. The best linear model found presented values of specificity = 90.31/90.40 and sensitivity = 88.14/88.07 in training/validation series. We carried out a comparison to nonlinear artificial neural network (ANN) techniques and previous models from the literature. Next, we illustrated the practical use of the model with an experimental case of study. We reported for the first time the isolation and characterization of terpenes from the plant *Cissus indica*. The antibacterial activity of the terpenes was experimentally determined. The more active compounds were phytol and α -amyrin, with MIC = 100 μ g/mL for Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Acinetobacter baumannii* resistant to carbapenems. These compounds are already known from other sources. However, they have been isolated and evaluated for the first time here against several strains of multidrug-resistant bacteria including World Health Organization (WHO) priority pathogens. Last, we used the model to predict the activity of these compounds versus other microorganisms with different MRNs in order to find other potential targets.



1. INTRODUCTION

The current situation of bacterial resistance according to the World Health Organization (WHO) is alarming.¹ Bacterial resistance to conventional antibiotics has risen dramatically over the past decade, depleting treatment options and fundamentally altering the approach to infection prevention and treatment.² The unabated rise in antibiotic resistance, coupled to collateral damage to normal flora by overuse of broad-spectrum antibiotics, requires the development of new antibiotics that are specifically active against multidrug-resistant and extensively drug-resistant Gram-negative bacteria.³ The global threat of antibiotic-resistant bacteria has led to development of different strategies to address this problem. In this sense, understanding the metabolism of pathogens plays

an important role, although little known, in the development of antibiotic resistance. Several approaches that integrate experimental data at the level of systems with metabolic networks (for example, genomic scale)⁴ have recently been applied to elucidate the metabolic dependencies of resistance, as well as to identify pharmacological targets and possible antibacterials.⁵ In fact, Bambas's group and other authors have demonstrated the influence of the changes in metabolic reaction networks (MRN_i) over the capacity of survival of

Special Issue: Machine Learning in Drug Discovery

Received: January 8, 2019

Published: February 25, 2019

De: Current Topics in Medicinal Chemistry <admin@bentham.manuscriptpoint.com>

Enviado: jueves, 21 de noviembre de 2019 12:48 a. m.

Para: MARIA DEL RAYO CAMACHO CORONA <maria.camachocn@uanl.edu.mx>

CC: ctmc@benthamscience.net <ctmc@benthamscience.net>; qasit@benthamscience.net <qasit@benthamscience.net>; yasirmaqsood@benthamscience.net <yasirmaqsood@benthamscience.net>


Asunto: Manuscript Acceptance letter | BMS-CTMC-2019-HT76-1237-4

Reference#: BMS-CTMC-2019-HT76-1237-4

Submission Title: Antibacterial Activity of Cissus incisa Extracts against Multidrug-Resistant Bacteria

Dear Dr. María del Rayo Camacho Corona,

I am pleased to inform you that your article entitled "**Antibacterial Activity of Cissus incisa Extracts against Multidrug-Resistant Bacteria**" has been accepted for publication in "**Current Topics in Medicinal Chemistry**" after independent peer review.




Search for...


Q Search

Advanced Search

Search in: ☒ All ☐ Article ☐ Chapter ☐ eBook

[Login](#) [Register](#) [Shopping Cart](#)


[Home](#) [Publications](#) [Articles By Disease](#) [Bentham Online](#) [Marketing Opportunities](#) [For Librarians](#) [For Authors & Editors](#) [More](#)



Full-Text Inquiry

Research Article

Antibacterial Activity of Cissus incisa Extracts against Multidrug-Resistant Bacteria

(E-pub Ahead of Print)

Author(s): Deyani Nocedo-Mena, Elvira Garza-González, Mauricio González-Ferrara, María del Rayo Camacho-Corona*.

Journal Name: Current Topics in Medicinal Chemistry

DOI : 10.2174/1568026619666191121123926

Journal Home

Trabajos presentados MOL2NET 2018, International Conference on Multidisciplinary Sciences (4th edition), publicados en MOL2NET: FROM MOLECULES TO NETWORKS (PROC. BOOK), ISBN: 978-3-03842-820-6, 2019, Vol. 4, 2985 pp.

MOL2NET, 2018, 2(14), pages 1- x
<http://sciforum.net/conference/mol2net-02/wrsamc>

1



SciForum
MOL2NET

Analysis of chemical composition of *Cissus incisa* leaves by GC/MS

Deyani Nocedo-Mena¹, Mauricio González-Ferrara², María del Rayo Camacho-Corona^{1*}

¹Autonomous University of Nuevo León, Faculty of Sciences. Av. Universidad S / N, University City, CP 66451, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México; E-Mail: deyani.nocedomn@uanl.edu.mx

²PACALLIS. de R.L. de C.V. CP 64740, Monterrey, Nuevo León, México;

E-Mail: mauricio@pacalli.com.mx

*Corresponding author; Email: maria.camachocn@uanl.edu.mx. Telephone number: +52 (81) 83294000 ext 3463

MOL2NET, 2018, 4, <http://sciforum.net/conference/mol2net-04> 1



MOL2NET, International Conference Series on Multidisciplinary Sciences

Cissus incisa: a potential source of therapeutic agents

Deyani Nocedo-Mena^a, Mauricio González-Ferrara^b, María del Rayo Camacho-Corona^{a*}

^aAutonomous University of Nuevo Leon, Faculty of Sciences. Av. Universidad S / N, University City, CP 66451, San Nicolás de los Garza, Nuevo Leon, Mexico. (E-Mail: deyaninocedo@yahoo.com)

^bPacalli, The House of Herbs, CP 64740, Monterrey, Nuevo León, Mexico. (E-Mail: mauricio@pacalli.com.mx)

*Corresponding author; (Email: maria.camachocn@uanl.edu.mx) Telephone number: +52 (81) 83294000 ext 3463



Triterpenoids identified by GC-MS in chloroform/methanol extract from leaves of *Cissus incisa*

Deyani Nocado-Mena^a, Mauricio González-Ferrara^b, María del Rayo Camacho-Corona^{a*}

^aAutonomous University of Nuevo León, Faculty of Sciences. Av. Universidad S / N, University City, CP 66451, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. (E-Mail: deyaninocado@yahoo.com)

^bPACALLIS de R.L. de C.V. CP 64740, Monterrey, Nuevo León, México.
(E-Mail: mauricio@pacalli.com.mx)

*Corresponding author; Email: maria.camachocn@uanl.edu.mx. Telephone number: +52 (81) 83294000 ext 3463



Antibacterial activities of triterpenes from leaves of *Cissus incisa*

Deyani Nocado-Mena^a, Elvira Garza^b Mauricio González-Ferrara^c, María del Rayo Camacho-Corona^{a*}

^aAutonomous University of Nuevo León, Faculty of Sciences. Av. Universidad S / N, University City, CP 66451, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. (E-Mail: deyaninocado@yahoo.com)

^b Universidad Autónoma de Nuevo León, Servicio de Gastroenterología, Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González. Av. Gonzalitos y Madero S/N, Colonia Mitras Centro, CP 64460, Monterrey, Nuevo León, Mexico. E-Mail: elvira_garza_gzz@yahoo.com

^cPACALLIS de R.L. de C.V. CP 64740, Monterrey, Nuevo León, México.
E-Mail: (mauricio@pacalli.com.mx)

*Corresponding author; Email: maria.camachocn@uanl.edu.mx. Telephone number: +52 (81) 83294000 ext 3463



USEDAT: USA-Europe Data Analysis Training

MOL2NET 2019, International Conference on
Multidisciplinary Sciences, 5th edition,
MDPI Sciforum, Basel, Switzerland, 15 Feb–20 Dec
<https://mol2net-05.sciforum.net/usedat-07>

Name: Deyani Ncedo Mena

Participation as: Student, Collaborating Prof.

Prof. Contribution: [i] Course Lecturer, [ii] Workshop Chairperson, [iii] Institutional Support, [iv] Tutoring/Sent Students
Course: Perturbation-Theory Machine Learning in Medicinal Chemistry, Biomedical Engineering, and Nanotechnology.

Type of Course: Summer Internship, Post-Doc Stay, PhD Training, MSc Training, Deg. Project, Other: _____

Student Country: USA, Spain, Portugal, China, India, Colombia, Mexico, Ecuador, Cuba, Other: _____

Place: UPV/EHU, Dept. Org. Chem. II., Leioa, Great Bilbao, Biscay, Spain.

Course Lecturers: Prof. S. Arrasate and Prof. H. González-Díaz

Contact Hours: 50h.

Sincerely yours
USEDAT & MOL2NET Chairman:
Prof. Humbert González-Díaz,
IKERBASQUE Professor,
Email: mol2net.chair@gmail.com



(1) Dept. of Org. Chem. II, Univ. of the Basque Country UPV/EHU, 48940, Leioa, Great Bilbao, Biscay, Spain. (2) IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, 48011, Bilbao, Biscay, Spain.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9392-2797>

SDDN2108

CERTIFICATE OF PRESENTATION

This is to certify that

Deyani Nocedo Mena, Carlos Cornelio,
Maria del Rayo Camacho Corona, Sonia Arrasate

Presented the Poster entitled:

Aplicación de un modelo PTMLIF con redes metabólicas en la predicción de
la actividad antibacteriana de productos naturales

at the X Spanish Drug Discovery Network Meeting, held in Bilbao, Spain,
on 22-23 November 2018.

Oscar Millet, Ph. D.

Group Leader

Protein Stability and Inherited Disease Laboratory
CIC bioGUNE

SPANISH
Drug Discovery Network 

CICbioGUNE
CONSEJO REGULADOR DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS


Universidad
del País Vasco Euzkadi Herriko
Unibertsitatea

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Deyani Nocedo Mena

Candidato para el grado de

Doctor en Ciencias con Orientación en Farmacia

Tesis: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS
CONSTITUYENTES DE LAS HOJAS DE *Cissus incisa*,
DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA,
CITOTÓXICA Y MECANISMO DE ACCIÓN DEL COMPUESTO
MÁS ACTIVO

Campo de estudio: Productos naturales

Biografía: Datos Personales: Nacida en Villa Clara, Cuba el 1 de junio de 1975, hija
de Vladimir Nocedo González y Lutgarda Mena Fernández.

Educación: Egresada de la Universidad Central “Martha Abreu” de Las Villas, Cuba,
grado obtenido Licenciado en Ciencias Farmacéuticas en 1998. Egresada
de la Universidad de Ciencias Médicas “Serafín Ruíz de Zárate Ruíz”,
Cuba, grado obtenido Maestro en Medicina Bioenergética y Natural en
2007.

Experiencia Profesional: Farmacéutico de Atención Hospitalaria en el Hospital Pediátrico “José
Luis Miranda”, Villa Clara, Cuba, desde 1998. Profesor Instructor de la
Universidad Central “Martha Abreu” de Las Villas, Cuba, desde 2010.
Especialista en Gestión Comercial en la Empresa Comercializadora y
Distribuidora de Medicamentos Villa Clara, Cuba, hasta 2016.